SÉRIE A, N° 3932
N° D'ORDRE :
4783

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean GARNIER

1re THÈSE

ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA PROTÉOLYSE PAR LA PRÉSURE DE LA CASÉINE KAPPA

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 8 juin 1962 *devant la Commission d'examen.*

MM. WURMSER *Président.*
CHAMPETIER, TONNELAT } *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538112_0069

SÉRIE A, N° 3932
N° D'ORDRE :
4783

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean GARNIER

1re THÈSE

ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA PROTÉOLYSE PAR LA PRÉSURE DE LA CASÉINE KAPPA

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 8 juin 1962 *devant la Commission d'examen.*

MM. WURMSER *Président.*
CHAMPETIER, TONNELAT } *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY.

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie et Cristal.
TEISSIER.....	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie vég. (Orsay).
AUGER	T	Physique quantique et Relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).
CARTAN.....	T	Mathématiques (E. N. S.).
LAFFITTE.....	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E. N. S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE.....	T	Géologie S. P. C. N. et sédim.
GAUTHERET.....	T	Biologie vég. (P. C. B.).
LUCAS R.....	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique Enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P. C. B.).
FORTIER	T	Mécanique exp. des Fluides.
DANJON	T	Astronomie.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY.....	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
L'HÉRITIER.....	T	Biologie générale (Orsay).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL.....	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD.....	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT.....	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et struc.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et Cristallog.
J. P. MATHIEU	T	Physique (Optique).
COUTEAUX.....	T	Biologie animale (P. C. B.).
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et Intégral.
CHOUARD.....	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Techn. aéronaut.).
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral.
NORMANT	T	Synthèse organique générale.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
DUGUÉ.....	T	Statistiques mathém.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale.
MARÉCHAL.....	T	Optique théorique et appl.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON ...	T	Physiologie de la nutri.
SALEM	T	Mathématiques générales.
LELONG	T	Applic. de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comp.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S. P. C. N.).
GLANGEAUD	T	Géographie phys. et Géologie dynamique.
GODEMENT	T	Mathématiques (M. P. C.).
PISOT	T	Tech. mathém. de la Phys.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMAN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Paléontologie stratig.
ZAMANSKY.....	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M. G. P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN.....	T	Électrotechnique géné.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY....		Biologie végétale (PCB).
PIAUX	T	Chimie (M. C. P.).
BRUN	T	Mécan. théorique des Fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
Mme DUBREIL	T	Mathém. (Agrégation).
Mme LELONG	T	Mathématiques (E. N. S.).
BELLAIR.....	T	Géologie (S. P. C. N.).
COTTE	T	Physique électricité.
DUBOIS J. E.	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T	Énergétique générale.
ROUAULT	T	Électricité (Orsay).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL.....	T	Physique atomique.
BUSER		Physiologie comparée.
CAMUS		Physiologie vég. BMPV.
CASTAING.....	T	Physique (Orsay).
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie.
MOYSE	T	Physiologie vég. (Orsay).
NOIROT		Évolution des Etres org.
PANNETIER	T	Chimie générale (Orsay).
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie théorique.
TEILLAC	T	Physique nucl. et Radioactivité.
TONNELAT	T	Biologie physico-chim.
VILLE	T	Économétrie.
WILLEMART		Chimie (P. C. B.).
DODE	T	Chimie (Orsay).
FREYMANN	T	Recherches physiques.
GUINOCHET	T	Biol. vég. SPCN (Orsay).
ROLLET	T	Chimie (P. C. B.).
Mlle JOSIEN	T	Chimie S. P. C. N.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Électronique (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay).
GERMAIN	T	Mécan. théor. des fluides.
LUCAS G.	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.

BERTHELOT	T	Phys. fondamentale des Hautes Énergies (Orsay).
BRICART	T	Météorologie et Phys. de l'Atmosphère.
Mme ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie
FRIEDEL		Physique des Solides (Ors).
M. JULIA		Études des moléculaires naturelles complexes.
LENDER	T	Biol. animale (SPCN) Orsay.
MAGAT		Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle QUINTIN	T	Électrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physiol. anim. (Orsay).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique.
HAISSINSKY	T	Radiochimie.
LEMEE	T	Physiol. vég. BMPV (Orsay)
GUERIN	T	Chimie M. P. C. (Orsay).
CHATELET M.		Chimie (P. C. B.).
JEAN	T	Physique nucléaire (Orsay).
MATTLER	T	Physique S. P. C. N.
MICHEL L.		Phys. théor. des Htes Énergies (Orsay).
BERGERARD		Zoologie (Orsay).
BERTEIN		Électronique (Orsay).
BOUISSIÈRES		Chimie des Radioéléments (Orsay).
Mme COUTURE		Thermodynamique et Méc. physique.
ELLENBERGER		Géol. appl. sur le terr.
FRANC		Biol. animale (P. C. B.).
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay)
STOLKOWSKI		Physiologie générale.
ACHER		Chimie biol. (Orsay).
BAUDOIN		Biologie animale P. C. B.
BEAUMONT		Biologie animale SPCN.
BLAMONT		Géophysique Ionosphère.
BOURREAU		Botanique.
CURIE D.		Physique (M. G. P.).
DURAND-DELGA		Géologie.
FREON	T	Chimie organique (Orsay).
HELLER		Physiologie végétale.
TORTRAT		Calcul des Probabilités.
CAILLEUX		Géologie (S. P. C. N.).
MAGNAN	T	Physique (S. P. C. N.).
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire. appliquée à la chim. théor. et à la Phys. nucléaire.
Mlle FOURCROY		Biol. végétale (SPCN).
Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Méc. analytique et Méc. céleste.
Mlle VEIL		Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNCK	T	Mécan. phys. et expérim.
LACOMBE	T	Métallurg. des métaux nucl.
BROCHARD	T	Physique P. C. B. (Orsay).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathématiques MPC (Orsay).
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay).
CAIRE		Géographie phys. et Géol. dynamique.
COMOLET		Mécanique des Fluides.
CORABŒUF		Physiologie animale.
DELLOUE		Physique de l'exosphère.
GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
HOUILLON		Biologie animale P. C. B.
JULLIEN J.		Chimie P. C. B.
MALGRANGE		Tech. math. de la Phys.
OLIVIER		Antropologie.
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE		Physique ENS. (Orsay).

Secrétaire général .... R. POULLAIN.

A MES PARENTS

A MA FEMME

A Monsieur G. MOCQUOT

Directeur de la Station centrale de Microbiologie
et Recherches laitières à l'I. N. R. A.

En témoignage de profonde reconnaissance.

Ce travail a été accompli à la Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières de l'I. N. R. A., dirigée par M. G. Mocquot. Je voudrais ici lui témoigner mon affection et toute ma gratitude pour sa bienveillance et les précieux conseils dont il m'a fait constamment bénéficier.

M. le Professeur Wurmser, directeur de l'Institut de Biologie physico-chimique, nous a montré beaucoup de sollicitude et de compréhension dans l'étude de nos problèmes. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude pour son accueil, son enseignement et pour avoir bien voulu accepter de présider mon jury.

M. le Professeur Tonnelat a bien voulu accepter de faire partie de mon jury ; je tiens à l'en remercier ainsi que de l'intérêt qu'il a montré à ce travail et des judicieuses remarques qu'il m'a faites.

Je suis reconnaissant à M. le Professeur Champetier, membre de l'Institut, d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'être membre de mon jury et je tiens ici à le remercier respectueusement.

Enfin j'ai une dette de reconnaissance à l'égard de Mlle Yon, maître de recherches au C. N. R. S. pour l'intérêt qu'elle a su montrer à ce travail et pour les nombreuses et fécondes discussions que j'ai eues avec elle. J'ai été également très touché de l'accueil que m'ont réservé tous les membres du Laboratoire de Biologie physico-chimique.

Je dois beaucoup à l'Institut national de la Recherche agronomique, grâce auquel j'ai pu préparer cette thèse, ainsi qu'à tous mes collègues de la Station, en particulier M. C. Alais, à qui je dois des renseignements précieux et des échanges de vue fructueux.

Je n'oublie pas la collaboration technique efficace de Mme G. Brignon, qui m'a beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail.

PREMIÈRE THÈSE

ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA PROTÉOLYSE PAR LA PRÉSURE DE LA CASÉINE KAPPA

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 15

I. — CINÉTIQUE DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES.

11. — Théorie de V. HENRI-MICHAELIS 17
12. — Détermination expérimentale de la constante de MICHAELIS K_m et de la vitesse maximum 17
13. — Variation des constantes de MICHAELIS et des constantes de vitesse k_s avec la température :
131. — Constantes thermodynamiques correspondant à la formation du complexe intermédiaire 18
132. — Constantes thermodynamiques correspondant à l'activation du complexe 18

II. — PRÉPARATIONS.

21. — Présure 21
22. — Caséine entière 22
221. — Précipitation isoélectrique 22
222. — Précipitation par le calcium 22
23. — Caséine $\varkappa$ 23
24. — Caséine α_s 24

III. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES.

31. — Méthode de précipitation trichloracétique 26
311. — Principe 26
312. — Technique 26
313. — Critique 27
32. — Précipitation par le calcium 29
321. — Principe 29
322. — Inactivation de la présure 29
323. — Technique 30
324. — Critique 30
33. — Mesure des protons libérés 31
331. — Principe 31
332. — Technique 33
333. — Critique 36
34. — Choix d'une méthode pour l'étude cinétique 36
341. — Comparaison entre la libération des protons et celle du caséino-glycopeptide 36
342. — Comparaison entre la libération du caséino-glycopeptide et la précipitation de la caséine entière par le calcium 36
343. — Influence du pH sur la mesure des protons libérés 38
344. — Conclusion 41

IV. — Étude cinétique de la protéolyse de la caséine $\varkappa$.

41. — Variation des vitesses de protéolyse avec la concentration en présure 43
42. — Variation des vitesses de protéolyse avec la concentration en substrat à différentes températures 46
421. — Résultats expérimentaux 47
422. — Équivalence de la constante de Michaelis et de la constante de dissociation du complexe présure-caséine $\varkappa$ 49
423. — Énergétique de la formation du complexe présure-caséine $\varkappa$..... 50
43. — Variation des vitesses de protéolyse avec la température : énergie d'activation 50
44. — Discussion..... 51
441. — Constante de Michaelis 51
442. — Constante de vitesse de décomposition du complexe présure-caséine $\varkappa$. 52
443. — Variation d'énergie libre, d'entropie et d'enthalpie d'activation 53

V. — Étude cinétique de la protéolyse de la caséine $\varkappa$ en présence de caséine α_s.

51. — Action de la présure sur la caséine α_s 54
52. — Action inhibitrice de la caséine α_s. Comparaison entre la méthode de mesure des protons libérés et la méthode de précipitation trichloracétique 54
53. — Influence du pH sur l'inhibition 57
54. — Étude du mécanisme de l'inhibition..... 58
541. — Inhibition de la réaction enzymatique 58
5411. — Cas général 58
5412. — Cas particuliers..... 59
542. — Rétrogradation de l'ionisation du groupe carboxylique 59
5421. — Cas général 59
5422. — Cas particuliers..... 60
543. — Étude expérimentale de l'inhibition en fonction de la concentration en caséine $\varkappa$ 61
544. — Étude expérimentale de l'inhibition en fonction de la concentration en caséine α_s 61
55. — Discussion et conclusion..... 65

VI. — Conclusion..... 66

Sommaire 68

Bibliographie 68

INTRODUCTION

La relation entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique de la présure lorsque cet enzyme agit sur le lait est assez difficile à définir en raison même du nombre de facteurs qui interviennent dans un milieu biologique aussi complexe. Notre but a été de déterminer quelques propriétés de la présure cristallisée en suivant l'activité protéolytique de cet enzyme sur la caséine entière et la caséine $\varkappa$ étant donné le rôle prépondérant que jouent ces protéines dans la coagulation du lait.

Lorsque la présure est utilisée à des doses de l'ordre de 100 γ/ml ou plus, elle se comporte comme un enzyme protéolytique ordinaire, assez voisin de la pepsine au point de vue de sa spécificité d'après Fish (1) et elle est capable de protéolyser plus ou moins complètement d'assez nombreux substrats : l'hémoglobine (2), la sérum albumine (3), l'insuline (1) et la caséine (4 et 3). Cependant des doses 100 à 200 fois plus faibles sont habituellement utilisées pour la coagulation du lait et, dans ces conditions, l'action de la présure se fait plus discrète et plus spécifique. A partir de la caséine sont alors libérés plusieurs peptides représentant une faible proportion (1 à 4 p. 100) de la protéine initiale (5 et 6). Parmi ces peptides le caséino-glycopeptide décrit par Alais (7) est très caractéristique de l'action de la présure et d'enzymes possédant une activité coagulante comme la pepsine (8 et 9).

Cette protéolyse « limitée », mais cependant nécessaire à la coagulation, a été étudiée par Nitschmann et *al.* (10) sur la caséine entière. Ces auteurs ont traité cette protéolyse comme une réaction chimique du premier ordre. Il nous a paru utile de reprendre cette étude sur un substrat purifié, la caséine $\varkappa$, en supposant que la protéolyse se comportait comme une réaction simple, suivant la loi des réactions enzymatiques telle qu'elle est exprimée par la relation d'Henri $ds/dt = k_s es/(K_m + s)$ avec e et s correspondant aux concentrations en enzyme et en substrat, k_s et K_m aux constantes de vitesse et de Michaelis.

Aprés avoir analysé les différentes techniques d'études dont nous disposions, nous avons choisi de suivre l'apparition des protons par potentiométrie à pH constant. Cette technique, par sa grande sensibilité, est particulièrement bien adaptée à la faible protéolyse qu'il faut mesurer, d'autant plus que nous avons pu utiliser un appareillage spécial permettant de déceler de très petites variations de pH. Nous l'avons comparée à deux autres techniques moins précises et plus laborieuses. La concordance de ces techniques entre elles et l'absence de produits intermédiaires nous semblent apporter la preuve que nous avons mesuré réellement la vitesse d'attaque du substrat à l'origine du phénomène de la coagulation.

La raison principale du choix de la caséine $\varkappa$ comme substrat pour ces études quantitatives est le rôle qu'elle joue comme stabilisateur des micelles de caséine vis-à-vis du calcium du lait. Un tel rôle d'un constituant de la caséine avait déjà été pressenti par Linderstrom-Lang (11) mais il n'a été que récemment défini par Waugh (12). L'action de la présure se traduirait par la destruction de ce constituant qui

ne pourrait plus remplir son rôle ; la coagulation des micelles de caséine en résulterait. Nous avons trouvé que la caséine $\varkappa$ se révélait particulièrement sensible à l'attaque par la présure. Nous avons pu déterminer le nombre des liaisons rompues au cours de cette attaque et nous avons formulé une hypothèse concernant leur nature.

A partir des variations de la vitesse initiale avec la concentration en substrat, nous avons déterminé les valeurs des constantes de MICHAELIS et les vitesses maximum à plusieurs températures comprises entre 25 et 40° C. Nous avons déterminé les énergies d'activation en mesurant les vitesses de réaction à plusieurs températures.

Nous avons mis en évidence une interaction entre la caséine $\varkappa$ et un autre constituant de la caséine entière appelé caséine α_s. Cette étude est une étape vers la reconstitution du phénomène de la coagulation dans son ensemble.

CHAPITRE PREMIER

CINÉTIQUE DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES

11. — Théorie de V. HENRI-MICHAELIS

Dès 1903, V. HENRI (13) montrait que le mécanisme de l'action catalytique d'un enzyme comporte deux étapes essentielles : l'union réversible entre l'enzyme E et le substrat S pour donner un complexe intermédiaire, ES, et la dissociation irréversible de ce complexe en produits de la réaction et enzyme libre. Cette théorie, après avoir été reprise par MICHAELIS et MENTEN (14), fut généralisée ensuite par HALDANE (15 et 16). Le schéma de la réaction est le suivant :

$$(1) \qquad E + S \underset{k_1'}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_s} E + P$$

k_1, k_1' et k_s sont les constantes de vitesse respectives de formation, dissociation et décomposition du complexe intermédiaire ES.

Lorsque l'état stationnaire est réalisé, l'expression de la vitesse, v, de la réaction à chaque instant est :

$$(2) \qquad v = \frac{k_s\, e\, s}{K_m + s}$$

avec $K_m = \dfrac{k_1' + k_s}{k_1}$, e et s représentant les concentrations respectives de l'enzyme et du substrat libre. Lorsque la concentration de l'enzyme est petite vis-à-vis de celle du substrat, la concentration du substrat libre s peut être assimilée à celle du substrat total. En pratique, si l'état stationnaire est rapidement atteint, on mesure la vitesse dans la partie initiale de la réaction où la concentration du substrat est la concentration initiale, s_0, facile en général à mesurer avant l'addition d'enzyme.

D'après l'équation (2) les vitesses initiales doivent être proportionnelles aux concentrations de l'enzyme pour une concentration donnée du substrat.

12. — Détermination expérimentale de la constante de MICHAELIS K_m et de la vitesse maximum

Parmi les différents procédés proposés pour représenter graphiquement les variations de la vitesse avec les concentrations du substrat pour déterminer K_m, le plus précis et le plus pratique est celui d'EADIE (17) qui consiste à écrire l'équation (2) sous la forme :

$$(3) \qquad v = V_M - K_m\, v/s \qquad \text{où} \qquad V_M = k_s e.$$

La constante K_m a les dimensions d'une concentration ; elle est exprimée en mg/ml ou en mole litre. Si les concentrations en enzyme et substrat peuvent s'exprimer en moles par litre et le temps en secondes, k_s s'exprime en secondes^{-1}.

La constante de MICHAELIS K_m n'a pas d'interprétation simple sauf si k_s est négligeable devant k'_1. Dans ce cas, l'inverse de K_m représente l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

13. — Variation des constantes de MICHAELIS et des constantes de vitesse k_s avec la température

131. — Constantes thermodynamiques correspondant a la formation du complexe intermédiaire

Les variations de la constante de MICHAELIS K_m avec la température ne sont pas en général interprétables sauf si K_m se confond avec la constante d'équilibre k'_1/k_1 du complexe enzyme-substrat. Dans ce cas la variation d'énergie libre ΔF de formation du complexe est reliée à K_m par la relation :

$$\Delta F = - RT \log_e 1/K_m \tag{4}$$

où R désigne la constante des gaz parfaits, égale à 1,98, et T la température absolue.

Or la variation d'énergie libre, ΔF, est liée aux variations d'entropie ΔS et d'enthalpie ΔH par la relation :

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S \tag{5}$$

$$\text{d'où } \log_e K_m = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R} \text{ et } - \frac{d \log_e K_m}{d\,(1/T)} = - \frac{\Delta H}{R}$$

En pratique, on porte graphiquement le logarithme décimal de K_m en fonction de I T, la valeur absolue de la pente de la droite ainsi obtenue est égale à $\Delta H/2{,}3\ R$.

Connaissant ΔF et ΔH, on en déduit la variation d'entropie, ΔS, d'après l'équation (5).

132. — Constantes thermodynamiques correspondant a l'activation du complexe

L'effet catalytique de l'enzyme est d'autant plus marqué que la variation d'énergie qui sépare l'état initial du complexe ES de son état activé ES* est plus petite, cette variation d'énergie est appelée énergie d'activation.

Les variations avec la température des constantes de vitesse de réaction, k, permettent de déterminer l'énergie d'activation expérimentale, μ, d'après la loi d'ARRHENIUS :

$$\log_e k = C - \frac{A}{T} \qquad \text{et} \qquad \frac{d \log_e k}{dT} = \frac{A}{T^2} \tag{6}$$

A est appelé coefficient de température de la réaction et la valeur $A \times R = \mu$ l'énergie d'activation expérimentale ou incrément critique, elle représente, dans la théorie cinétique des gaz, le niveau minimum d'énergie que doivent atteindre les molécules pour entrer en réaction. La quantité C est pratiquement indépendante de la température.

Soit K* la constante d'équilibre entre les molécules du complexe ES et les molécules de ce complexe à l'état activé ES*.

$$K^* = \frac{(ES)^*}{(ES)} \tag{7}$$

La théorie des vitesses absolues permet d'établir la relation

$$k_s = \varkappa \frac{kT}{h} K^* \tag{8}$$

entre la constante d'équilibre K* et la constante spécifique de décomposition du complexe k_s exprimée en secondes $^{-1}$ où k est la constante de Boltzmann ($1{,}38 . 10^{-16}$ erg. degré$^{-1}$ ou R/N, N étant le nombre d'Avogadro) h la constante de Planck ($6{,}62 . 10^{-27}$ erg.s) et $\varkappa$ le cœfficient de transmission le plus souvent égal à l'unité. $\frac{kT}{h}$ est une constante universelle dépendant uniquement de la température, elle représente la fréquence avec laquelle le complexe activé traverse la barrière de potentiel.

On peut écrire, en faisant $\varkappa = 1$ et en dérivant par rapport à T le logarithme de l'expression (8)

$$\frac{d \log_e k_s}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{d \log_e K^*}{dT} \tag{9}$$

Or d'après les relations (4) et (5) appliquées à l'équilibre (7) :

$$\frac{d \log_e K^*}{dT} = \frac{\Delta H^*}{RT^2}$$

En comparant la relation (9) avec celle d'Arrhenius où :

$$\frac{d \log_e k_s}{dT} = \frac{\mu}{RT^2}$$

on en déduit que la valeur de μ est $\Delta H^* + RT$. Il suffit donc de connaître μ pour obtenir ΔH^*, puis ΔF^* à partir de k_s selon :

$$\Delta F^* = - RT \log_e \frac{hk_s}{kT}$$

et enfin ΔS^* qui représentent respectivement les variations d'enthalpie, d'énergie libre et d'entropie d'activation du complexe.

Dans le cas général où K_m varie avec la température on étudie la variation de k_s, d'après la mesure de la vitesse maximum à différentes températures. Si K_m ne varie pas avec la température ou bien est petit devant les concentrations du substrat, il n'est pas nécessaire de suivre la variation de la vitesse maximum. En effet d'après les équations (2) et (6) :

$$k_s = v \frac{K_m + s}{es}$$

$$\log_{10} k_s = \log_{10} v + \log_{10} \frac{K_m + s}{es} = \frac{C}{2{,}3} - \frac{\mu}{2{,}3 R} \times \frac{1}{T} \tag{10}$$

et $\log_{10} \frac{K_m + s}{es}$ est indépendant de la température. On obtient donc directement

l'énergie d'activation, μ, en portant le logarithme décimal de la vitesse en fonction de I/T, la pente de cette droite a pour valeur — $\mu/2{,}3$ R.

Pour que la valeur de μ corresponde bien à la décomposition du complexe intermédiaire il faut que tous les autres facteurs susceptibles de modifier la vitesse soient identiques à chaque température. Par exemple, il ne faut pas qu'il existe des réactions d'équilibre entre formes actives et inactives de l'enzyme ou du substrat liées à la température car alors, la vitesse observée ne dépendrait pas uniquement de la décomposition du complexe intermédiaire mais aussi de réactions à coefficient de température non nul.

CHAPITRE II

PRÉPARATIONS

21. — Présure

Nous avons utilisé la présure cristallisée selon la méthode de BERRIDGE (2). Deux préparations ont été employées : l'une provenant d'une solution stock préparée par C. ALAIS* (18) en tampon phosphate M/20 pH 6,3 et l'autre d'une suspension, en NaCl 2 M, de cristaux de présure Hansen fournie par B. FOLTMANN*. Cette suspension de cristaux a été conservée au congélateur à — 10°C. Pour préparer une solution stock les cristaux sont dissous dans un tampon phosphate pH 6,3 M/20 et dialysés 36 h contre ce même tampon. La solution est conservée ensuite au congélateur.

La dilution de présure est préparée environ 10 mn avant son emploi en diluant dans l'eau distillée une partie aliquote de la solution stock décongelée. Nous avons observé que les décongélations répétées de cette solution entraînaient une baisse du titre de la présure d'environ 1 à 2 p. 100 à chaque décongélation. Pour éviter cet inconvénient nous avons réparti au préalable la solution stock, à raison de 0,15 ml, en petits tubes à essais. Ceci a l'avantage de décongeler une seule fois la solution stock nécessaire à la préparation d'une dilution pour un essai. Dans ces conditions le titre de la présure est stable pendant plusieurs mois.

Tous les deux mois, un contrôle du pouvoir coagulant est effectué de la manière suivante : dans un tube à essai 18/180 maintenu au bain-marie à 35°C on ajoute 11 ml de lait entier, de mélange, préalablement réchauffé à 35°C (pipette à écoulement rapide) à 0,5 ml d'une dilution de présure. On bouche le tube avec un bouchon, on le retourne 3 fois et, environ 20 secondes avant la coagulation, on incline et on tourne très lentement le tube de façon à observer les premiers flocons sur une mince pellicule de lait. Le temps de coagulation, t', exprimé en secondes est comparé à celui obtenu avec une présure en poudre servant de témoin, t, et titrant 457 Unités présure/gramme.

L'unité présure (*U. P.*) que nous utilisons a été définie par BERRIDGE (2) comme la quantité de présure, contenue dans 1 ml qui coagule 10 ml d'un substrat standard (lait en poudre reconstitué) en 100 secondes à 30°C. Comme à 30°C la proportionnalité entre le temps de coagulation et la concentration en présure est moins bonne qu'à 35°C nous avons préféré effectuer nos titrages à 35°C et nous servir du titre de 457 *U. P.*/g de présure témoin établi par C. Alais (18 et 19).

(*) Nous tenons ici à le remercier d'avoir si obligeamment mis à notre disposition cette présure.

La présure témoin est une présure commerciale « Hansen ». Nous conservons une réserve de cette présure et celle-ci est renouvelée tous les ans, le nouveau lot étant étalonné par rapport au précédent. En fait, tous les lots de présure Hansen reçus ont présenté le même titre (19). Les dilutions de présure sont faites de telle sorte que les temps de coagulation soient de l'ordre de 4 à 5 minutes. Le nombre d'unités présure, x par ml, a été calculé en écrivant que le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en présure selon STORCH et SEGELCKE (20) :

$$\frac{457}{xd'} \frac{d}{} = \frac{t'}{t} \quad \text{ou} \quad x = 457 \frac{d}{d'} \times \frac{t}{t'}$$

dans laquelle : d est la dilution de la présure étalon (nombre de grammes, pour une présure en poudre, par ml de volume final de la dilution) :

d' la dilution de présure à titrer.

La concentration en présure, exprimée en γ/ml, a été calculée soit par dosage de l'azote au microKjeldahl (N $\times$ 6,38) soit par mesure de l'absorption à 278 mμ en utilisant le coefficient d'extinction $E_{1\ cm}^{1\ mg/ml} = 1{,}58$ en tampon phosphate pH 6,3 M 20 communiqué par B. FOLTMANN. Nous avons utilisé comme poids moléculaire de la présure 40 000 d'après SCHWANDER et *al.* (21) et nous avons observé que 21 γ de la présure fournie par C. ALAIS correspondaient à 1 U. P. contre 12 γ de la présure Hansen.

22. — Caséine entière

Les différentes préparations de caséine ont été effectuées à partir du lait écrémé de mélange provenant du troupeau des vaches laitières du C. N. R. Z. Nous avons utilisé deux techniques de préparation de la caséine entière.

221. — Précipitation isoélectrique

C'est la méthode la plus ancienne, elle a été l'objet de nombreux travaux en particulier ceux d'HAMMARSTEN (22), et elle consiste à précipiter le lait à pH 4,7, puis à redissoudre la caséine à pH 7. Cette opération est répétée à nouveau trois fois en lavant soigneusement chaque fois le précipité à l'eau distillée. Nous avons abandonné la technique habituelle de séchage du précipité par traitement à l'acool, puis à l'éther. Nous avons préféré lyophiliser la solution de caséinate à pH 7. Ce procédé a l'avantage de fournir une caséine facilement soluble dans l'eau distillée. De plus, le traitement à l'acool amorce le début d'un fractionnement de la caséine, une certaine quantité de cette caséine étant soluble dans la première solution de lavage à l'alcool.

222. — Précipitation par le calcium

Nous avons utilisé la méthode de WAUGH et VON HIPPEL (23 et 24) qui consiste à centrifuger à 45 000 g et à 37°C les micelles de caséine du lait. Les micelles centrifugées sont dissoutes dans une solution de citrate de potassium 0,1 M pH 6,5, puis dialysées et lyophilisées. On obtient ainsi une caséine aisément soluble dans l'eau distillée que WAUGH a appelée, pour cette raison, caséine soluble ou encore

caséine 1er cycle par opposition à la préparation obtenue par une deuxième précipitation par le calcium (caséine 2e cycle) dont les propriétés sont très différentes de la caséine entière ou caséine 1er cycle.

Les concentrations en caséine entière ont été déterminées par dosage de l'azote par microKjeldahl en multipliant la quantité d'azote trouvée par le facteur conventionnel 6,38.

23. — Caséine $\varkappa$

Nous avons préparé la caséine $\varkappa$ selon la technique décrite par McKenzie et Wake (25). Les caséines sensibles au calcium sont séparées de la caséine entière par précipitation par le calcium (0,36 M) à 37°C. Après élimination des ions calcium du surnageant par addition d'oxalate de potassium et centrifugation, la caséine $\varkappa$ est obtenue par précipitation avec le sulfate de sodium, dissolution dans l'eau distillée et reprécipitation par l'acétate d'ammonium en milieu alcoolique à 50 p. 100. Ce précipité mucilagineux forme une sorte de gomme qui s'agrège à l'agitateur de verre ; il est redissous dans l'urée 6 M et dialysé contre une solution NaCl 0,005 M. La précipitation par l'acétate d'ammonium, la dissolution par l'urée et la dialyse sont effectuées une deuxième fois et la solution finale est centrifugée 40 mn à 90 000 g pour éliminer les traces de graisse et lyophilisée. Nous avons observé que nous obtenions des résultats plus reproductibles en ce qui concerne le rendement, environ 5 g de caséine $\varkappa$ pour 150 g de caséine entière, en effectuant la précipitation par le sulfate de sodium à raison de 860 g de Na_2SO_4 10 H_2O ajoutés à un litre de solution. Cette quantité correspond à 25 g de Na_2SO_4 anhydre pour 100 ml de volume final protéine + sulfate de sodium ; c'est une concentration sensiblement plus élevée que celle recommandée par l'auteur : 25 g de Na_2SO_4 pour 100 ml de solution de protéine.

Nous avons déterminé le coefficient d'extinction en mesurant la densité optique à 278 mμ d'une solution de caséine $\varkappa$ dialysée pendant 3 jours contre une solution de NaCl 0,15 ou 0,3 M additionnée d'imidazole à la concentration de 0,002 M en changeant la solution de dialyse chaque jour. La dialyse contre une solution de NaCl a été employée pour réduire l'effet Donnan, l'imidazole pour éviter une baisse trop forte du pH. Les extraits secs ont été obtenus après dessiccation sous vide pendant 24 h à 110°C et nous avons déduit de l'extrait sec d'une partie aliquote de la solution dialysée, l'extrait sec de la solution de dialyse. Les mesures d'absorption à 278 mμ ont été faites en tampon phosphate pH 6,9 $\mu = 0{,}1$ et nous avons trouvé $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/ml}} = 1{,}05 + 0{,}05$ moyenne de 4 mesures. Cette valeur de E nous a servi pour calculer les concentrations en caséine $\varkappa$. Le poids moléculaire a été pris égal à 26 000 d'après McKenzie et Wake (26).

La caséine $\varkappa$, de même que la caséine β, est certainement l'une des préparations les mieux purifiées parmi celles isolées de la caséine entière. Elle montre par électrophorèse à différents pH une remarquable homogénéité. Tous les échantillons de caséine $\varkappa$ préparés ont permis des mesures de protéolyse très reproductibles.

24. — Caséine α_s

Nous avons utilisé la technique de Waugh et *al.* (27), nous la décrirons un peu en détail car elle n'a été publiée jusqu'à maintenant que sous forme de résumé.

Réactifs.

1) Tampon Tris 2M : 242,3 g de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane par litre.
2) $CaCl_2$ 5 M : 735, 15 g de $CaCl_2$ $2H_2O$ par litre ; la solution est filtrée sur verre fritté G 3.
3) Citrate 0,05 M : 32,44 g de K_3 $C_6H_5O_7$ H_2O pour deux litres, le pH est ajusté à 7,2 avec l'acide citrique cristallisé.
4) Acétate de sodium 2 M pH 5,5 : à 412 ml d'une solution à 164 g/litre de Na $C_2H_3O_2$ on ajoute 88 ml d'une solution d'acide acétique (115,5 ml d'acide acétique concentré par litre). On complète à 1 000 ml avec de l'eau distillée.

Mode opératoire

La caséine 1er cycle provenant d'un litre de lait écrémé préparée selon la technique citée ci-dessus (§ 222) après dialyse est refroidie à 0-2°C. Le pH est ajusté à 7,3 avec du tampon Tris et on ajoute 60 ml de $CaCl_2$ 5 M pour un litre de la solution de protéines en maintenant le pH à 7,3 avec du tampon Tris. On réchauffe ensuite à 10°C en agitant, au bain-marie. Après centrifugation de 30 mn à 1 250 g à 10°C on sépare un précipité collant aux parois de verre. Ce précipité est dissous dans une solution de citrate 0,05 M à pH 7,5 sous agitation, en fragmentant les grains de précipité à l'aide d'une spatule. Le pH est maintenu entre 6,5 et 7,0 par addition d'acétate de sodium à pH 5,5. Le volume de la solution de citrate qu'il est nécessaire d'employer est assez variable selon la préparation. Si une addition supplémentaire de citrate n'est pas suffisante pour dissoudre complètement le précipité il peut être nécessaire de diluer pour éviter de précipiter la protéine par relargage. Quand la dissolution est terminée la solution est amenée à la concentration de 0,1 à 0,2 p. 100 en protéine par addition d'eau distillée froide (volume final 4 l environ). La concentration est mesurée approximativement par absorption à 278 mμ en prenant un coefficient d'extinction $E^{1\ mg/ml}_{1\ cm} = 1$. A cette solution refroidie (7 à 10° C) on ajoute à nouveau du $CaCl_2$ 5 M jusqu'à formation du précipité, on laisse déposer le précipité et on décante le surnageant. Le précipité est redissous dans le citrate 0,05 M et la précipitation répétée deux autres fois. Finalement la solution dans le citrate est dialysée contre l'eau distillée et lyophilisée.

Nous avons utilisé le coefficient d'extinction établi par Waugh et *al.* (27) $E^{1\ mg/ml}_{1\ cm} = 1{,}06$ à 278 mμ pour calculer les concentrations en caséine α_s.

CHAPITRE III

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

La protéolyse de la caséine par la présure ne se déroule pas comme une protéolyse ordinaire. Aussi est-elle passée pendant longtemps inaperçue. Alors qu'il était possible de mettre facilement en évidence l'activité de la présure par son pouvoir coagulant sur le lait ou sur une solution de caséinate de calcium, les méthodes classiques d'étude de la protéolyse (précipitation trichloracétique et dosage de l'azote précipité, méthodes titrimétriques de LINDERSTRØM-LANG ou de WILLSTÄTTER) ne montraient aucune protéolyse appréciable lorsqu'on opérait avec les concentrations en présure utilisées pour observer la coagulation.

HAMMARSTEN avait émis l'hypothèse que la présure libérait une substance azotée appelée protéose ou « molken albumose » ; mais la préparation de présure utilisée contenait de la pepsine et la relation entre la protéose et la présure pouvait donc être mise en doute. En 1953, ALAIS, MOCQUOT, NITSCHMANN et ZAHLER (5) reprenaient cette question en utilisant la présure cristallisée (ne contenant pas de pepsine) et ils montraient que l'action de la présure s'accompagnait de la libération d'une petite quantité de substances azotées solubles dans l'acide trichloracétique ; la proportion, variable selon la concentration de l'acide trichloracétique, était d'environ 1 p. 100 de l'azote total pour une concentration finale de l'agent déféquant de 12 p. 100. C'est une protéolyse très limitée ce qui explique qu'il soit difficile de la mettre en évidence en particulier lorsqu'on emploie des techniques mettant en jeu un « blanc » très important, par exemple les techniques qui permettent de doser l'azote précipité par l'acide trichloracétique ou de déterminer la variation du nombre total des groupes carboxyliques (LINDERSTRØM-LANG) ou des groupes aminés (WILLSTÄTTER-VAN SLYKE).

Dans le laboratoire de M. WURMSER et sous la direction de M^lle YON nous avons vérifié que la technique de LINDERSTRØM-LANG (28) ne permet pas de mettre en évidence l'apparition de nouveaux groupes carboxyliques lors de l'action de la présure sur la caséine. En effet la caséine entière n'est pas soluble dans la zone de pH du titrage ce qui diminue de façon appréciable la sensibilité de la méthode. Nous n'avons pas non plus observé l'apparition de nouveaux groupes aminés au cours de l'action de la présure sur la caséine $\varkappa$ par la méthode gazométrique de VAN SLYKE (29 et 30), méthode que nous avons utilisée dans le laboratoire de M. FAUCONNEAU sous la direction de M. PION. Quoique la protéolyse subie par la caséine $\varkappa$ soit très supérieure à celle de la caséine entière, (10-12 p. 100 d'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100), la méthode n'est pas assez précise pour que l'on puisse conclure à l'absence de nouveaux groupes aminés.

Il se pose donc un problème particulier à cette étude : c'est de trouver une technique assez sensible pour obtenir des données quantitatives. Il faut également que cette technique permette la mesure des vitesses d'attaque du substrat protéique par l'enzyme et enfin il faut voir si cette activité est en relation avec l'activité coagulante de la présure. De la réponse donnée aux deux premiers points dépend l'interprétation des constantes cinétiques trouvées ; de celle donnée au troisième dépend la possibilité de relier les résultats cinétiques à l'activité coagulante de l'enzyme.

Parmi les différentes méthodes habituellement employées pour suivre une protéolyse et compte tenu de ce que nous avons signalé ci-dessus, nous avons retenu la méthode de précipitation trichloracétique et la méthode titrimétrique à pH constant. De plus nous avons mis au point une méthode de précipitation par le calcium, méthode applicable seulement à la caséine entière mais qui nous permettra de relier nos résultats à l'activité coagulante de la présure.

31. — Méthode de précipitation trichloracétique

311 — Principe

En solution aqueuse la plupart des protéines sont précipitées par l'acide trichloracétique ; seuls les acides aminés et certains polypeptides restent en solution. Comme la protéolyse est faible nous avons déterminé les produits solubles dans l'acide trichloracétique pour éviter un « blanc » élevé. Nous avons dosé l'azote, car les produits libérés par la présure n'absorbent pas à 280 mμ et une mesure spectrophotométrique à cette longueur d'onde ne peut donc apporter un résultat (7).

312 — Technique

Dans un erlenmeyer de 30 ml placé au bain-marie on ajoute à 6 ou 10 ml de substrat, 0,05 ou 0,1 ml d'une solution de présure à l'aide d'une pipette à striction jaugée. Au bout d'un temps donné d'action de la présure, on arrête la réaction en ajoutant 2 ml d'une solution concentrée d'acide trichloracétique calculée pour obtenir une concentration déterminée en acide trichloracétique du mélange final. Cette addition est faite à l'aide d'une seringue jaugée de 2 ml (rhéomètre de Vernes). Le piston et le corps de pompe de cette seringue sont en verre. Son emploi permet l'addition rapide du réactif et assure une excellente reproductibilité des mesures de volumes ($\pm$ 0,3 p 1000). Le mélange est agité puis filtré au bout de 10 minutes sur filtre Durieux à bande blanche, filtration courante, de 55 mm de diamètre. L'azote est dosé sur 3 ou 4 ml du filtrat, en double, par microKjeldahl. Les teneurs en azote du filtrat sont déterminées en tenant compte du volume du précipité : cela revient à multiplier les teneurs en azote du filtrat par le coefficient

$$c = 1 - (\mathrm{NT} - \mathrm{N.\ P.\ N.}) \times 6{,}38 \times \frac{0{,}75}{1000}$$

NT et N. P. N. représentant respectivement les teneurs en azote total et en azote non protéique du mélange enzyme-substrat + acide trichloracétique.

313 — Critique

Plusieurs éléments interviennent dans le choix de la concentration finale en acide trichloracétique. Tout d'abord il faut que cette concentration soit suffisamment élevée pour que la réaction de protéolyse soit inhibée. Or nous avons observé que pour les faibles concentrations il y avait toujours un écart entre la valeur de protéolyse au temps zéro (obtenue avec la présure inactivée par chauffage), et celle du

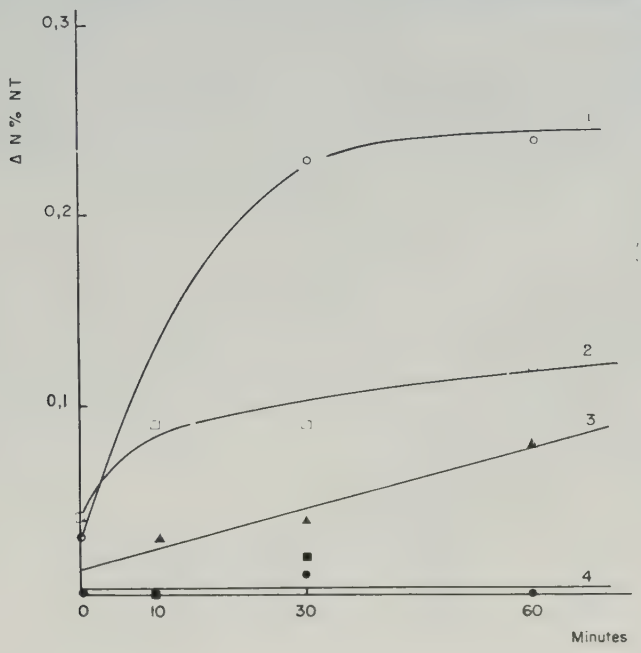

Fig. 1. — *Activité résiduelle de la présure dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100*
Concentration en caséine entière : s = 27,6 mg/ml,
Concentration en présure :
courbe 1 o—o e = 0,086 U. P./ml (1,8 γ/ml) ;
courbe 2 □—□ e = 0,043 U. P./ml (0,9 γ/ml) ;
courbe 3 ▲—▲ e = 0,017 U. P./ml (0,36 γ/ml) ;
courbes 4 ●—● e = présure inactivée par ébullition ;
■—■ même essai que celui représenté par la courbe 2 mais après 10 mn d'action de la présure.
Température : 25°C.
En abscisses : temps séparant la filtration de la défécation en minutes;
En ordonnées : augmentation de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 en pourcent de l'azote total.

temps immédiatement voisin, si réduit que soit l'intervalle les séparant. La figure 1 représente la quantité d'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 en fonction du temps séparant la défécation de la filtration, lorsque la présure est ajoutée en même temps que l'acide trichloracétique. La quantité d'azote soluble est faible mais elle croît avec le temps et d'autant plus vite que la concentration en présure est élevée. Elle est certainement en relation avec une activité résiduelle de la présure sur une protéine insoluble, en milieu trichloracétique. Il ne semble pas que ce soit une solubilisation progressive des produits de la réaction, d'abord parce qu'ils doivent être inexistants si les additions d'enzyme et d'agent déféquant

sont bien simultanées, et ensuite parce qu'après 10 et 60 minutes de protéolyse, on n'observe plus cette augmentation de l'azote soluble alors que les produits de la réaction sont au contraire plus abondants. Nous avons déterminé qu'il fallait une concentration finale en acide trichloracétique d'au moins 5. p. 100 pour inhiber l'activité résiduelle de la présure (voir fig 2). Il semble d'autre part que cette activité résiduelle soit d'autant plus marquée que l'acide trichloracétique ajouté est plus dilué pour une même concentration finale.

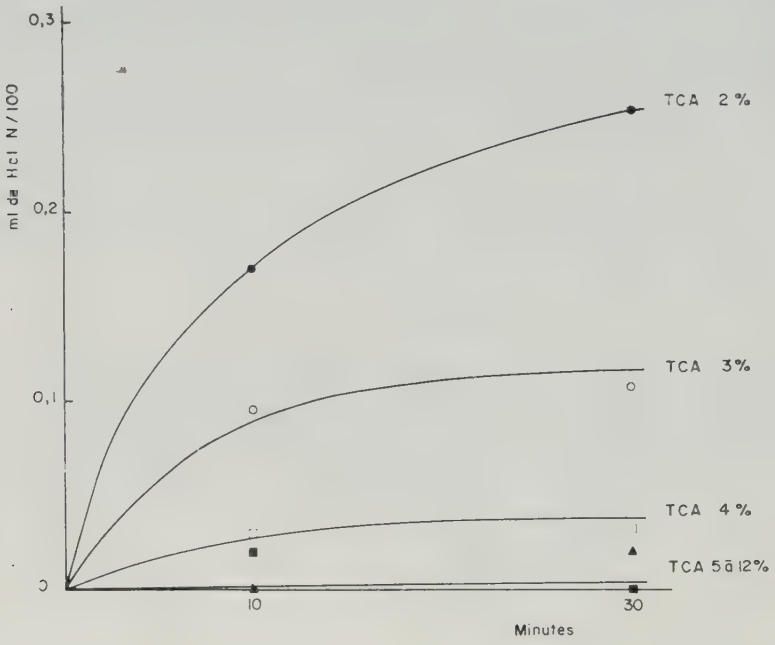

FIG. 2. — *Activité résiduelle de la présure en fonction de la concentration en acide trichloracétique*
Concentration en caséine entière : 13 mg/ml,
Concentration en présure : 0,35 U. P./ml (4,2 γ/ml),
Température : 23°C.
En abscisses : temps séparant la filtration de la défécation ;
En ordonnées : Azote soluble dans le filtrat trichloracétique exprimé en valeur relative en ml d'acide chlorhydrique N/100 blanc déduit.

Mis à part cette activité résiduelle qui est faible et n'affecte que les vitesses initiales, ALAIS, MOCQUOT, NITSCHMANN et ZAHLER (5) avaient déjà montré une différence entre les courbes de libération d'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 et à 12 p. 100. NITSCHMANN et BOHREN (10) ont repris cette étude et ils ont nettement distingué, dans le cours de la réaction, une protéolyse primaire et une protéolyse secondaire. La protéolyse primaire est constituée par une libération rapide de produits azotés solubles dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 et caractéristique semble-t-il du phénomène de coagulation. En effet ce type de protéolyse d'après MATTENHEIMER et NITSCHMANN (8) est retrouvé avec des enzymes autres que la présure ayant une activité coagulante, en particulier la pepsine. La protéolyse secondaire n'est visible qu'avec des concentrations d'acide trichloracétique inférieures à 12 p. 100 ; en particulier à 2 p. 100, elle est donnée par tous les enzymes

protéolytiques et ne semble donc pas spécifique de la coagulation. Enfin elle est peu importante sauf aux pH très acides.

Nous avons donc choisi d'étudier la relation existant entre l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 et les autres techniques. Il se trouve que, d'après Alais (7), cette matière azotée soluble est une substance homogène bien définie appelée caséino-glycopeptide et dont la composition et la structure ont déjà été étudiées par Nitschmann et Henzi (6), Nitschmann et Beeby (31) et par Jolles et Alais (32). Ces auteurs ont trouvé pour cette substance la même composition peptidique, qu'elle soit préparée à partir de la caséine κ (dont elle provient en fait) ou à partir de la caséine entière.

La méthode de précipitation trichloracétique est une méthode précise mais demandant la mise en œuvre de grandes quantités de substrat, la protéolyse étant très faible. C'est aussi une méthode longue puisqu'il faut passer par l'intermédiaire de la détermination de l'azote.

32. — Précipitation par le calcium

321 — Principe

La caséine entière a la propriété de s'associer sous forme de micelles en présence d'ions divalents, particulièrement de calcium. Pour des concentrations de Ca^{++} de l'ordre de 0,05 à 0,1 M les solutions de caséine prennent un aspect « laiteux » mais ne précipitent pas. La stabilité de ces micelles est remarquable et Waugh a montré qu'elles sont en équilibre avec des formes polymères de la caséine en solution. Après action de la présure, ces micelles forment un coagulum ; il en est de même si, à une solution de caséine entière, on ajoute du calcium après action de la présure. Nous avons utilisé cette dernière propriété pour voir si au cours de la réaction il y avait une augmentation progressive de caséine précipitable par le calcium ou paracaséine.

322 — Inactivation de la présure

Pour effectuer ces essais nous avons dû mettre au point une technique d'inactivation de la présure, car on ne connaît pas actuellement d'inhibiteur spécifique

TABLEAU I

Réversibilité de l'inhibition à pH 8,2

Temps de contact de la présure à pH 8,2 à 25°C	Activité résiduelle à pH 7
heures	
0	100
1	100
2	79
4	80

de cet enzyme. C'est ainsi qu'au cours de différentes expériences, nous n'avons pu trouver d'action inhibitrice de la part du caséino-glycopeptide fourni par C. Alais*

(*) Nous lui adressons ici tous nos remerciements.

ni de la part de l'inhibiteur de la trypsine du Soja fourni par Mlle Von*. Nous avons vérifié qu'une élévation du pH à 8,2, à 25°C, par addition de soude, inhibe pratiquement l'activité de la présure mais que cette inhibition est soit complètement, soit partiellement réversible en ramenant le pH à 7 avec l'acide chlorhydrique, la température étant toujours maintenue à 25°C. Dans le tableau 1 la quantité de caséino-glycopeptide libérée en 60 minutes par la présure active a été prise comme base 100. Les précipitations par le calcium devant se faire à pH 7 on voit qu'il n'est pas possible d'utiliser l'élévation du pH à 8,2 pour inactiver irréversiblement la présure.

TABLEAU 2

Inactivation de la présure à 80°C

Temps de chauffage secondes	Temps de coagulation du lait à 35°C
1	55 s
5	10 mn 10 s
10	> 1 h

Nous avons alors choisi d'inactiver cet enzyme par chauffage. Nous avons déterminé qu'une élévation de la température à 80°C pendant 10 secondes était suffisante pour obtenir une inactivation irréversible (tableau 2). D'autre part ce chauffage ne modifie que très peu la sensibilité de la caséine au calcium.

323 — Technique

A 2 ml de solution de caséinate de sodium placés dans un tube de centrifugeuse maintenu à 30°C, on ajoute 0,1 ml d'une dilution de présure. Au bout d'un temps déterminé on plonge ce tube dans un bain de sable porté à 350-450°C pendant 10 secondes et en agitant la solution ; c'est le temps nécessaire pour élever la température de la solution de 30 à 80°C. Puis on agite la solution pendant à nouveau 10 secondes hors du bain de sable et on refroidit sous l'eau du robinet pendant 30 secondes. A la solution refroidie on ajoute 1 ml d'une solution de CaCl2 0,09 M, on agite, on laisse au bain-marie à 30°C pendant 15 minutes et on centrifuge 15 minutes à 700 g. On dose l'azote du surnageant par microKjeldahl.

324 — Critique

Cette méthode a l'avantage de présenter d'une manière cinétique l'action de la présure sur la caséine en utilisant une propriété fondamentale de la paracaséine, son instabilité vis-à-vis du calcium (voir fig. 3). Elle a l'inconvénient de ne pas s'appliquer à la caséine $\varkappa$, insensible au calcium, et aussi celui d'être peu précise. De plus une partie de la caséine entière (17 à 19 p. 100) sédimente par centrifugation avant toute action de la présure. Enfin au cours de la réaction, un des produits de cette réaction, le caséino-glycopeptide s'ajoute à la caséine non précipitée.

(*) Nous lui adressons ici tous nos remerciements.

Cependant la quantité de caséino-glycopeptide formé est suffisamment faible au début de la réaction pour être négligeable.

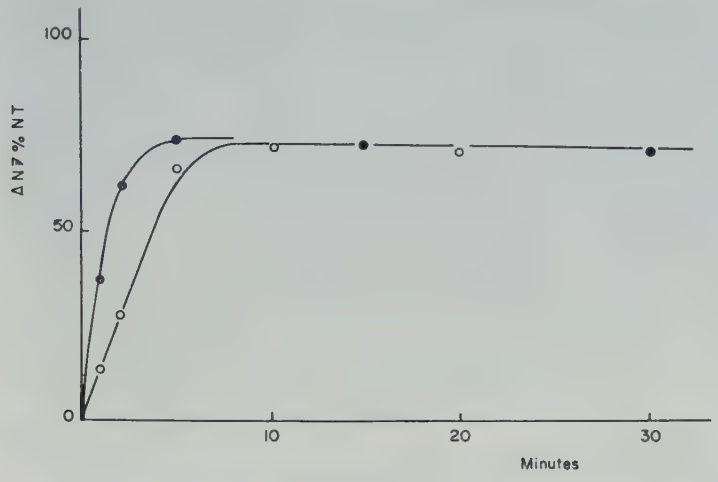

FIG. 3. — *Augmentation de l'azote précipité par le calcium au cours de l'action de la présure sur la caséine entière*
Concentration en caséine entière : 27 mg/ml,
Concentration en présure ●—● 0,16 U. P./ml (3,3 γ/ml)
o--o 0,08 U. P./ml (1,6 γ/ml),
Température : 30°C, pH 6,9.
En ordonnées : azote précipité par le calcium exprimé en pourcent de l'azote total, déduction faite de l'azote précipité au temps zéro.
En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

33. — Mesure des protons libérés

Cette méthode consiste à mesurer la quantité de soude ajoutée en fonction du temps pour maintenir constant le pH de la solution en cours de protéolyse. Elle a été d'abord utilisée dans les réactions où un groupe acide relativement fort était libéré, pour étudier par exemple l'activité estérasique d'un enzyme. WALEY et WATSON (33), ont été les premiers à l'appliquer pour suivre la coupure des liaisons peptidiques d'une chaîne polypeptidique. Puis JACOBSEN, LEONIS, LINDERSTRØM-LANG et OTTESEN (34) ont construit un appareil automatique ou pH-stat.

331 — PRINCIPE

Si, lors de la coupure par l'enzyme d'une liaison covalente, il apparaît un groupe ionisable, celui-ci peut libérer des protons dans le milieu ou en fixer suivant sa nature et suivant les conditions de pH.

Par exemple, la coupure d'une liaison ester libère un groupe carboxylique et une fonction alcool : pour des valeurs du pH très supérieures au pK du groupe carboxylique ce dernier est entièrement ionisé, il y a libération d'un proton par liaison rompue et le milieu s'acidifie.

La coupure d'une liaison peptidique — CO-NH — par fixation d'une molécule d'eau donne — COO^- et NH^+ — sans prendre ni céder de protons au milieu. Mais si le pH de la solution est supérieur au pK du groupe NH_3^+ ce dernier se dissocie ;

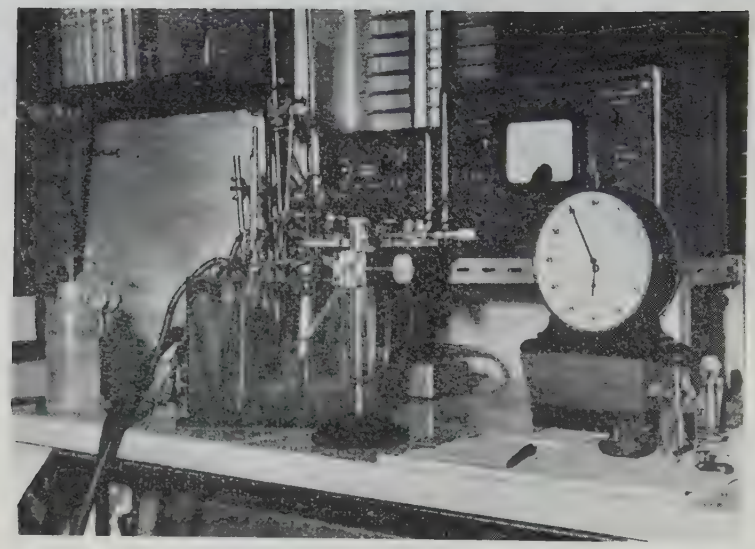

FIG. 4
Vue d'ensemble de l'appareillage utilisé pour la mesure des protons libérés par titrimétrie à pH constant.

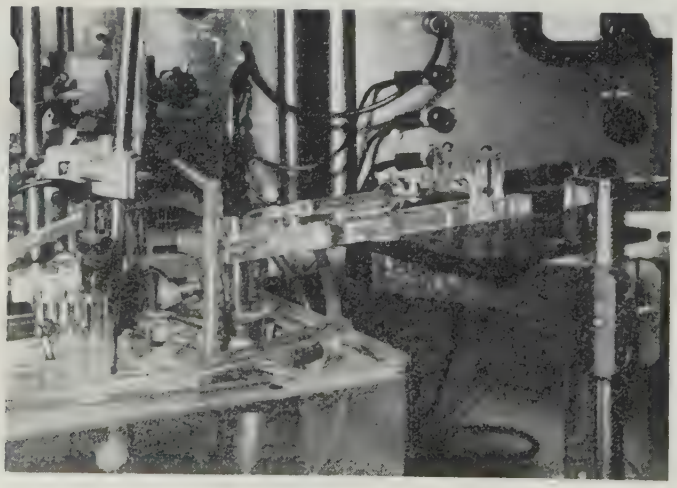

FIG. 5
Vue de détail montrant le dispositif expérimental de titration pour la mesure des protons libérés par titrimétrie à pH constant.

il y a libération de protons. Si le pH est inférieur au pK du groupe carboxylique, sa dissociation rétrograde et il y a fixation de protons, le milieu s'alcalinise.

A cela peut s'ajouter une variation de l'ionisation d'autres groupes dont le pK peut être modifié à cause du changement de taille du peptide. Par suite le rapport soude ajoutée /nombre de liaisons rompues n'est pas facilement calculable. En première approximation il est égal à $\frac{K}{K + (H^+)}$, K étant la constante de dissociation du groupe acide libéré en supposant que les constantes de dissociation des groupes voisins ne changent pas. Lorsque K est très grand devant H^+, pH $\gg$ pK, le rapport $\frac{K}{K + (H^+)}$ est voisin de 1, par exemple avec une différence d'une unité pH (K = 10 (H^+)) on dosera les 9/10 des groupes libérés, on en dosera 99/100 avec une différence de deux unités pH.

332 — Technique

Nous utilisons un pH-mètre Vibron (E. I. L.), très stable (sa dérive propre est inférieure à 2.10^{-3} unité pH en 12 h) et très sensible (il permet d'apprécier une variation de 5.10^{-4} unité pH) (voir fig. 4). 8 ou 5 ml de la solution à étudier sont

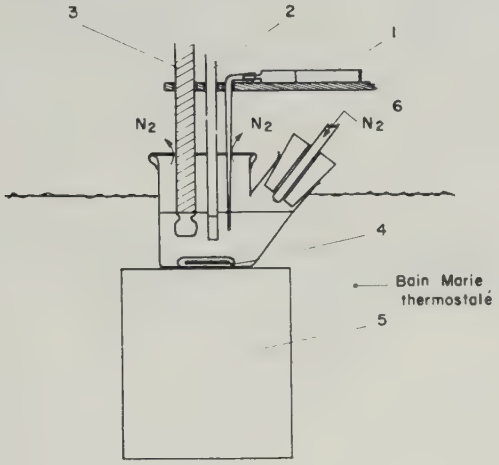

Fig. 6. — *Schéma du dispositif expérimental de titration.*

1 — microseringue « Agla » ;
2 — Pont KCL de l'électrode au calomel ;
3 — Électrode de verre blindée ;
4 — Barreau aimanté ;
5 — Agitateur magnétique ;
6 — Support monté sur crémaillère.

placés dans une cuve cylindrique spéciale d'un diamètre intérieur de 20 mm et d'une hauteur de 40 mm, à deux orifices (voir fig. 5 et 6). Par l'orifice latéral arrive un courant d'azote très pur, dépourvu de CO_2, à débit constant (250 ml/mn) et humidifié par barbottage dans un flacon d'eau distillée. Par l'autre orifice plongent l'électrode de verre blindée, le pont de KCL de l'électrode au calomel et la pointe capillaire de la microseringue « Agla ». Ces éléments sont solidaires et montés

sur un support à crémaillère. La cuve, l'électrode au calomel et le flacon servant à humidifier l'azote sont placés dans un récipient dont la température de l'eau est constante à ± 1/100 de degré près. L'agitation à l'intérieur de la cuve cylindrique est réalisée à l'aide d'une aiguille de fer enrobée de verre, actionnée par un agitateur magnétique « Camlab » à vitesse variable placé en dessous de la cuve, dans l'eau. L'agitateur magnétique et le pH-mètre sont reliés à une même prise de terre.

Le pH-mètre est d'abord étalonné à l'aide d'un tampon phosphate pH 6,96 $\mu = 0{,}1$ (phosphate disodique 0,0275 M et phosphate monopotassique 0,0225 M). La dérive propre du pH-mètre est toujours négligeable et constante devant la variation spontanée du pH des solutions étudiées dont l'équilibre de pH est long à s'établir. On considère que cet équilibre est atteint quand la dérive observée — en général vers les pH alcalins — est inférieure ou égale à 1.10^{-3} unité pH en 5 minutes, soit au

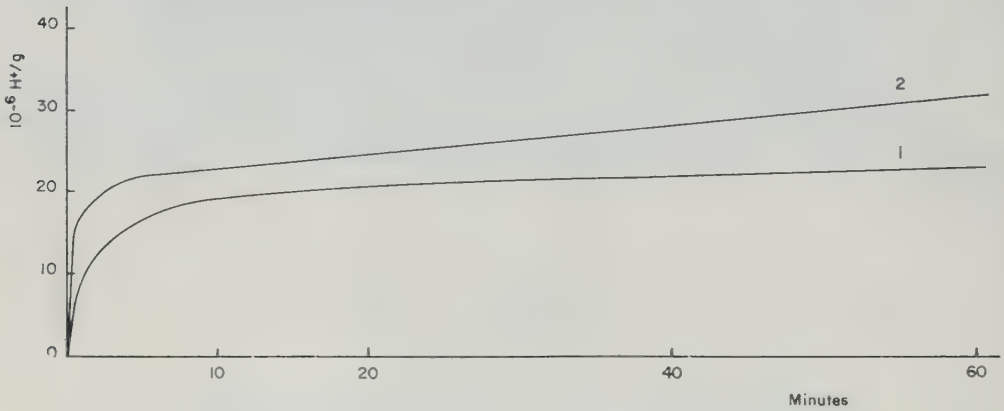

FIG. 7. — *Nombre de protons libérés au cours de l'action de la présure sur la caséine* $\varkappa$ *à* pH 6,95 *et à* 25°C
Courbe 1 $s = 3{,}7$ mg de caséine $\varkappa$/ml, $e = 0{,}086$ U. P./ml (1 γ/ml) ;
Courbe 2 $s = 5{,}2$ mg de caséine $\varkappa$/ml, $e = 5{,}2$ U. P./ml (62,5 γ/ml).
En ordonnées : mole de H^+ par gramme de caséine $\varkappa$;
En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

bout de 20 à 30 minutes pour la solution tampon. On remplace alors le tampon par la solution à étudier. Après 15 à 20 minutes, cette solution est ajustée à 0,1 unité pH au-dessous du pH désiré par addition de HCl N/10 ou NaOH N/10 à l'aide d'une pipette de 0,1 ml graduée en μl. Quand la dérive est à nouveau inférieure à 10^{-3} unité pH toutes les 2-3 minutes, ce qui demande encore environ une heure, le pH est ajusté à la valeur désirée par addition de soude N/100 à l'aide de la microseringue « Agla ». Après avoir vérifié pendant 1 à 2 minutes que la dérive est toujours inférieure ou égale à 10^{-3} unité pH/2-3 minutes, on ajoute à l'aide d'une pipette à striction 0,05 ml de la dilution de présure préalablement portée à la température de l'expérience et l'on déclenche le chronomètre. Il est recommandé de ne pas différer l'addition de présure quand l'équilibre défini ci-dessus est atteint car cet équilibre est transitoire : il dure environ 1 h, puis à nouveau une dérive est observée, cette fois vers les pH acides. Aux pH supérieurs à 6,3 l'addition de présure conduit toujours à une légère baisse de pH, d'environ 10^{-2} unité pH, que l'on compense par l'addition d'une certaine quantité de soude N 100. On ajoute ensuite un peu de

soude N/100 de façon à dépasser le pH fixé de 0,5 à 1.10^{-3} unité pH et on note le temps au bout duquel l'aiguille du pH-mètre revient au pH initial ; on ajoute alors une nouvelle quantité de soude N/100 et on note à nouveau le temps au bout duquel l'aiguille revient au même pH et ainsi de suite. On peut alors tracer, en fonction du temps, la quantité de soude nécessaire pour maintenir le pH constant et cette quantité est égale au nombre de protons libérés dans le milieu au cours de la réaction. Le premier point est obtenu après 30 à 45 secondes et il est possible de faire des mesures toutes les 10-15 secondes. Le point initial est déterminé par extrapolation

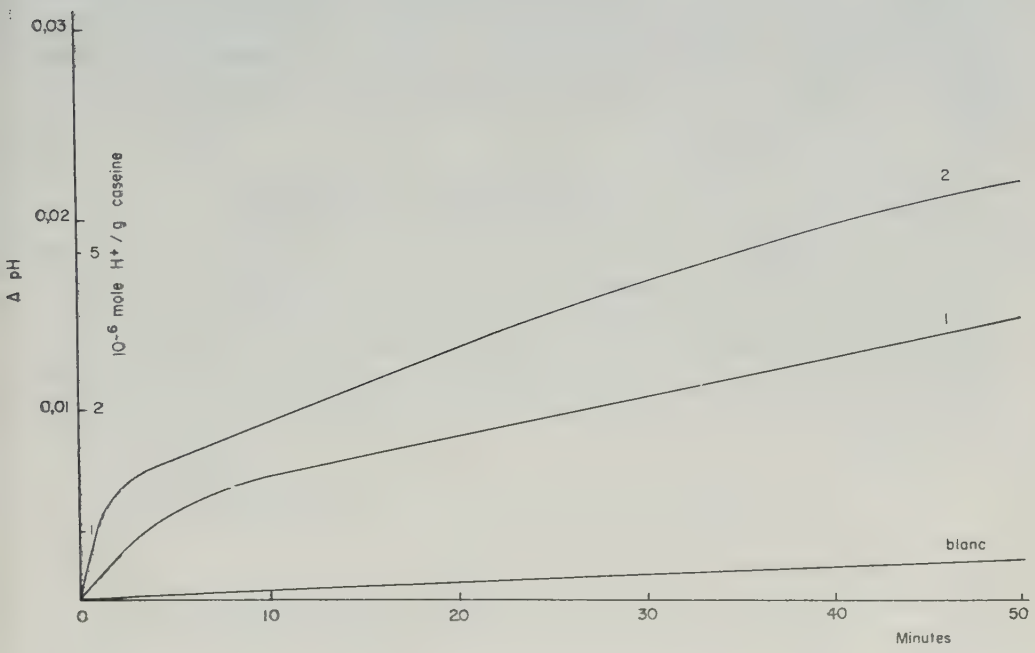

FIG. 8. — *Nombre de protons libérés au cours de l'action de la présure sur la caséine entière à* pH 6,95 *et à* 25°C

Courbe 1 s = 22 mg/ml, e = 0,066 U. P./ml (1,4 γ/ml);
Courbe 2 s = 22 mg/ml, e = 0,66 U. P./ml (14 γ/ml).
En ordonnées : variation du pH observé ou mole de H^+ par gramme de caséine entière ;
En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

de la courbe au temps zéro. La réaction est suivie pendant 5 minutes environ et la vitesse initiale n'est mesurée qu'à partir d'une minute ce qui représente le temps nécessaire pour rétablir l'équilibre de la solution perturbé par l'addition de l'enzyme.

Pour étudier l'action de la présure sur la caséine entière étant donné la variation extrêmement faible du pH, 0,5 à 1.10^{-2} unité pH, comparée à celle enregistrée avec la caséine κ : 5 à 10.10^{-2} unité pH, nous avons suivi la réaction en notant seulement le pH. Nous avons vérifié que le pouvoir tampon, $2,7.10^{-4}$ mole OH^-/g caséine entière/unité pH à pH 6,9, est constant sur 5.10^{-2} unité pH. Il est par suite possible de transformer la variation du pH observée en protons libérés. Les résultats obtenus pour deux concentrations différentes de présure ont été représentés dans la figure 7 pour la caséine κ et dans la figure 8 pour la caséine entière.

333 — Critique

Étant donné le petit nombre de protons libérés, l'appareillage, quoique très sensible, est utilisé aux limites de ses possibilités ce qui rend les mesures délicates. Ces mesures sont faites dans des intervalles de pH où les variations du potentiel de jonction de l'électrode au calomel, la stabilité de l'électrode de verre et des solutions protéiques ne sont plus tout à fait négligeables et il faut attendre un temps assez long pour qu'un équilibre soit atteint. Pour accroître la sensibilité de la méthode il est nécessaire de travailler dans un milieu où seule la protéine étudiée constitue le tampon et où la force ionique est suffisante, aussi avons-nous utilisé une concentration en NaCl de 0,1 M. L'erreur maximum sur la mesure d'une vitesse initiale est d'environ ± 10 p. 100 mais la reproductibilité des essais en double est souvent meilleure et de l'ordre de ± 5 p. 100.

34. — Choix d'une méthode pour l'étude cinétique

Des trois méthodes présentées, seules la méthode de précipitation trichloracétique et la méthode de mesure des protons libérés sont applicables à la caséine κ. Nous avons donc pensé à comparer entre elles ces deux méthodes et à étudier l'influence du pH sur la mesure des protons libérés. Comme différents auteurs ont établi une relation entre la libération du caséino-glycopeptide et la coagulation, nous avons également comparé cette libération et la « précipitabilité » de la caséine entière par le calcium.

341 — Comparaison entre la libération des protons et celle du caséino-glycopeptide

La figure 9 montre la relation trouvée à pH 6,95 entre la libération du caséino-glycopeptide, exprimé en azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100, et les protons libérés à partir de la caséine κ. Il existe une relation linéaire entre les deux phénomènes jusqu'à environ 70 p. 100 de la protéolyse. Pendant cette période, 1 200 ± 150 g d'azote sont libérés par mole de protons. Comme cet azote ne représente qu'environ la moitié de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 on peut en déduire que le poids moléculaire moyen des produits de la réaction par mole de protons est très élevé. On sait déjà d'ailleurs que le caséino-glycopeptide a un poids moléculaire de l'ordre de 8 000 d'après Nitschmann et *al.* (35) et de 15 600 d'après Brunner et *al.* (36).

342 — Comparaison entre la libération du caséino-glycopeptide et la précipitation de la caséine entière par le calcium

Compte tenu des erreurs d'expériences indiquées pour chaque point de la courbe représentée figure 10, il y a proportionnalité entre la quantité de caséino-glycopeptide libéré et la quantité de caséine précipitable par le calcium, sauf en fin de réaction. Mais il faut alors noter que, par centrifugation, on précipite toutes les particules à partir d'une certaine taille et qu'on ne peut plus suivre ainsi la réaction à partir du moment où toutes les particules ont atteint ou dépassé cette taille limite. Cette

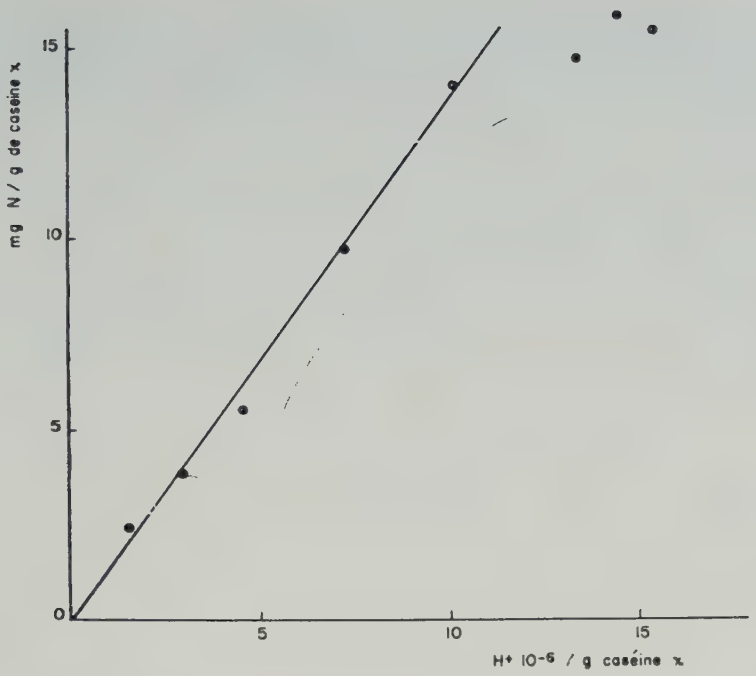

FIG. 9. — *Relation entre l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 et les protons libérés*
Concentration en caséine x : 5 mg/ml ;
Concentration en présure : 0,008 U. P./ml (0,09 γ/ml) ;
Température : 40°C.
En ordonnées : accroissement en mg de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 par g de caséine x (blanc déduit) ;
En abscisses : mole de protons libérés par g de caséine x.

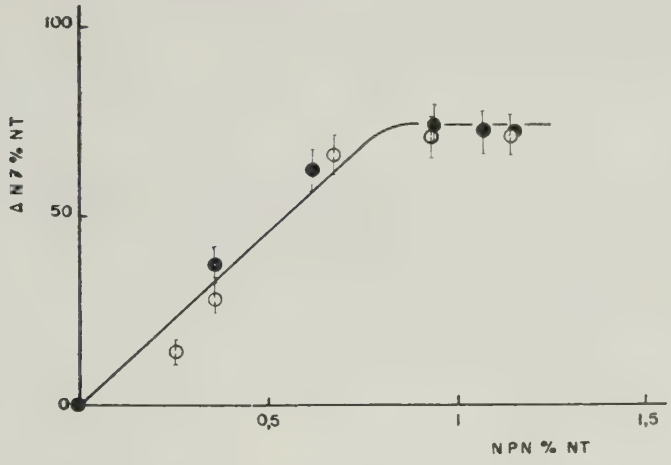

FIG. 10. — *Relation entre l'augmentation de l'azote non protéique soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 (N. P. N.) et l'accroissement de l'azote précipité par le calcium au cours de l'action de la présure (Δ N↓) exprimés en pourcent de l'azote total.*
Solution de caséine entière : $s = 29$ mg/ml ;
Présure cristallisée : ○ $e =$ 0,08 U. P./ml (1,6 γ/ml),
● $e =$ 0,16 U. P./ml (3,3 γ/ml),
Température 30°C ; pH 6,9.

corrélation entre les deux phénomènes confirme bien les conclusions de Mattenheimer et Nitschmann (8) et de Nitschmann et Keller (37) concernant la relation qui doit exister entre la protéolyse primaire ou libération du caséino-glycopeptide et la coagulation.

343 — Influence du pH sur la mesure des protons libérés

Pour identifier et dénombrer les groupes ionisables nous avons mesuré, à différents pH, les protons libérés.

La figure 11 représente deux courbes typiques de libération de protons, exprimés en unités arbitraires, à pH 5,4 et 7,4. Nous avons indiqué par des flèches la période de précipitation de la caséine $\varkappa$, la première flèche coïncide avec le début de l'opaci-

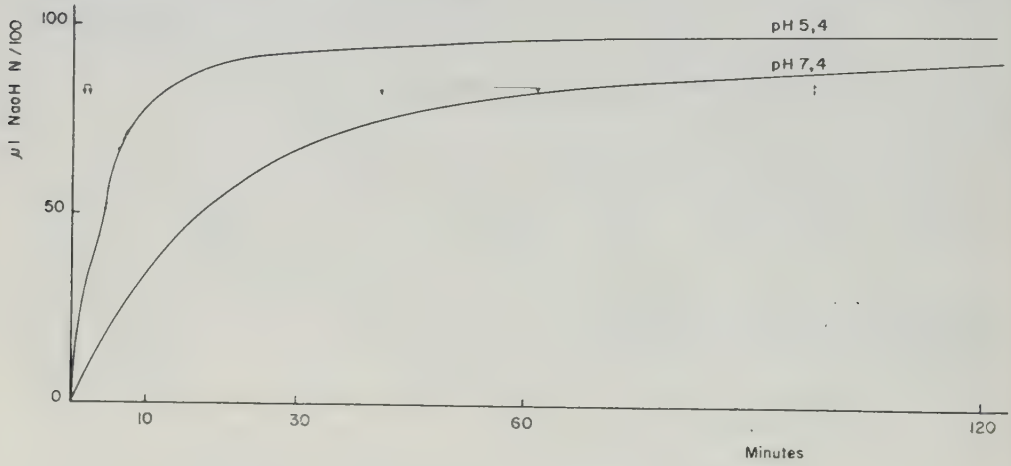

Fig. 11. — *Action de la présure sur la caséine $\varkappa$ à pH 5,4 et 7,4*
Concentration en caséine $\varkappa$: $s = 6{,}4$ mg/ml,
Concentration en présure : $e = 0{,}15$ U. P./ml (1,8 γ/ml),
Température : 25°C.
En ordonnées : protons libérés exprimés en valeur relative en µl de NaOH N/100 utilisés pour maintenir le pH constant.
En abscisses : temps en minutes.

fication et la deuxième avec l'apparition des grumeaux. On remarquera que la durée de ce phénomène et le moment de son apparition dépendent beaucoup du pH. La vitesse initiale est d'autant plus grande que les valeurs du pH sont plus faibles, étant donné que le pH optimum d'action de la présure est situé vers 4. Pour les pH inférieurs à 6, quand la précipitation est très rapide, on observe un décrochement passager dans le tracé de la courbe de libération des protons (voir fig 11). Nous avons vérifié par ailleurs que les quantités de caséino-glycopeptide libérées en fin de réaction ne variaient pas non plus d'une manière significative. Exprimées en pourcent de l'azote total, elles s'élèvent à 12,8 p. 100 à pH 5,4, 11,6 p. 100 à pH 6,9 et à 11, 9 p. 100 à pH 7,4. Nous avons reporté dans le tableau 3 les différentes valeurs des protons libérés en fin de réaction à différents pH. En fait, une faible protéolyse, appréciable seulement avec de fortes doses de présure (fig 7, courbe 2) se produit encore après le point que nous considérons comme marquant la fin de la réaction. Nous avons indiqué entre parenthèses, aux pH extrêmes, les valeurs individuelles pour chaque

expérience. Il y a une assez forte variation en particulier à pH 7,4, cela est dû au fait que ces mesures sont réalisées au bout d'un temps assez long et qu'alors la dérive du pH de la solution n'est plus négligeable ni très reproductible.

TABLEAU 3

Variations du nombre de protons libérés avec le pH

pH	10^{-5} H^+/g
7,4	1,87 (1,66 ; 1,37 ; 2,56)
6,9	1,85
6,4	2,0
5,9	1,93
5,4	1,90 (2,0 ; 1,81)
3,2	0

La caséine $\varkappa$ est insoluble entre pH 5,4 et 3,3 ; aussi n'avons-nous pas mesuré les protons libérés dans cette zone de pH. Cependant, à pH 3,2, nous avons obtenu, avec difficulté, une solution de caséine $\varkappa$ à laquelle nous avons ajouté de la présure : aucune libération de protons n'a été observée, bien que la caséine $\varkappa$ ait été effectivement transformée en paracaséine $\varkappa$. Ce dernier point a été vérifié, d'abord en observant que la paracaséine $\varkappa$ est soluble à pH 3,2 et (contrairement à la caséine $\varkappa$) conserve sa solubilité jusqu'à pH 4,4 environ ; ensuite en neutralisant (par addition de soude N/10) jusqu'à pH 7 et en observant alors la formation immédiate du précipité fibrillaire, caractéristique de la paracaséine $\varkappa$.

TABLEAU 4

Nombre de protons libérés à pH 6,9

Température	Concentration en présure U.P./ml	10^{-5} H^+/g
25°C	0,06	1,78
	0,10	2,67
	0,10	2,25
	0,14	2,29
	0,15	1,35
	0,15	1,55
	0,15	1,57
	0,15	1,96
	0,8	2,12
35°C	0,06	1,47
40°C	0,08	1,55

Nous avons indiqué, dans le tableau 4, les différentes valeurs du nombre de protons libérés pour différentes préparations de caséine $\varkappa$ et pour différentes conditions de température et de concentration en enzyme. La moyenne de ces résultats est 1,85. 10^{-5} H^+/g de caséine $\varkappa$ et l'écart type s' sur la moyenne,

$$s' = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n\,(n-1)}} = 0{,}13 \cdot 10^{-5}\ H^+\ g,$$

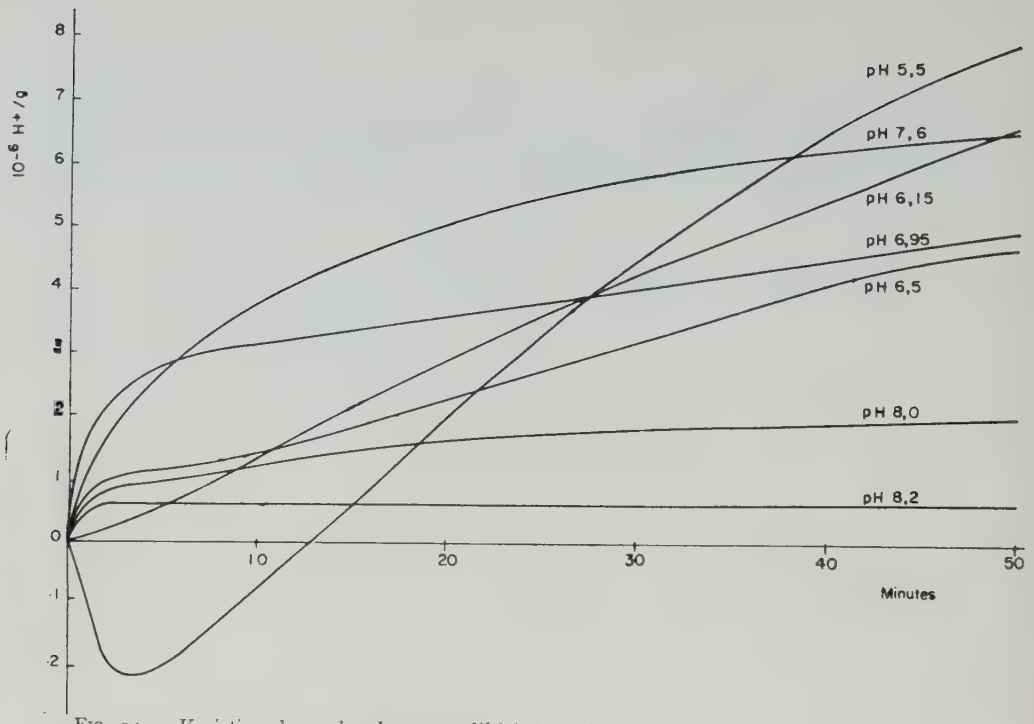

FIG. 12. — *Variations du nombre de protons libérés à partir de la caséine entière en fonction du* pH
Concentration en caséine $s = 15{,}2$ mg/ml sauf à pH 5,5 où $s = 17{,}9$ mg/ml ;
Concentration en présure $e = 0{,}35$ U. P./ml (4,2 γ/ml, sauf à pH 5,5 où $e = 0{,}09$ U. P./ml (1,0 γ/ml) ;
Température : 25°C ; NaCl = 0,1 M.
En ordonnées : protons libérés exprimés en mole de H^+ par gramme de caséine entière ;
En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

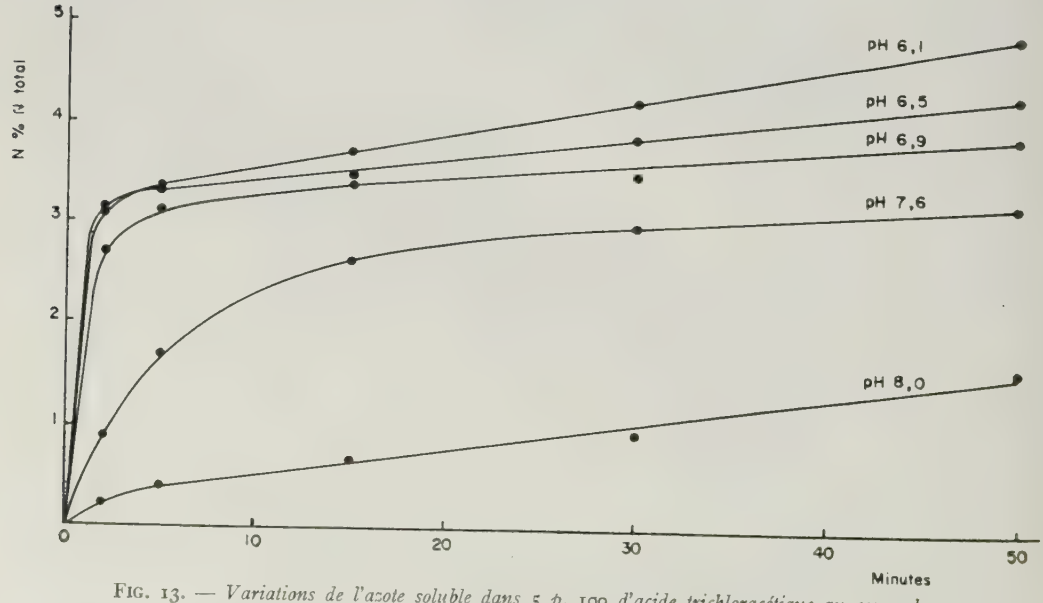

FIG. 13. — *Variations de l'azote soluble dans 5 p.* 100 *d'acide trichloracétique au cours de l'hydrolyse de la caséine entière par la présure à différents* pH
Conditions identiques à celles de la figure 12.
En ordonnées : augmentation de l'azote soluble en pourcent de l'azote total ;
En abscisses : temps d'action de la présure en minutes.

95 p. 100 des mesures sont donc comprises entre 1,45 et 2,15. 10^{-5} H^-/g. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les diverses préparations (5 au total) de caséine $\varkappa$ étudiées.

Dans la figure 12, nous avons réuni les résultats, très éloignés des précédents, obtenus avec la caséine entière. Cependant l'activité de la présure étudiée par la mesure de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 5 p. 100 ne suit pas ces variations (fig 13).

344 — Conclusions

Nous avons mis en évidence lors de l'hydrolyse de la caséine $\varkappa$ par la présure une relation linéaire entre les protons libérés et l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 ou caséino-glycopeptide. Ceci indique bien qu'en suivant le nombre de protons libérés, on suit également la libération du caséino-glycopeptide et qu'il peut s'agir par suite de la même réaction.

D'autre part, nous avons trouvé qu'il y a dans la caséine entière une relation linéaire entre la libération de ce caséino-glycopeptide et la sensibilité de la caséine au calcium comme si la coagulation était la conséquence du départ du caséino-glycopeptide libéré par la présure à partir de la caséine $\varkappa$ contenue dans la caséine entière.

Nous pouvons donc relier la mesure des protons libérés à l'activité coagulante de la présure.

La mesure des protons libérés se prête bien à une étude cinétique : c'est une méthode rapide, pouvant se faire sur de petites quantités de protéine, et relativement précise étant donné la faible protéolyse mise en jeu. Elle nous permet d'interpréter le nombre et la nature des liaisons rompues par la présure en supposant que les protons libérés proviennent directement de la coupure d'une liaison covalente à groupement ionisable. Certes, il est possible qu'une liaison covalente à groupement non ionisable soit coupée et que cette coupure entraîne une réorganisation de structure de la caséine $\varkappa$ avec apparition d'un nouveau groupe ionisable précédemment masqué. Mais ceci nous paraît peu vraisemblable, car cette liaison ne peut être ni une liaison ester ni une liaison peptidique ni non plus une liaison disulfure car il n'y a pas d'acides aminés soufrés dans le caséino-glycopeptide (6, 31 et 32).

Nous avons constaté que, dans la zone de pH comprise entre 5,4 et 7,4, le nombre de groupes titrés ne varie pas, compte tenu de la précision de nos mesures (Tabl. 3). Parallèlement, nous avons vérifié que la quantité totale de caséino-glycopeptide ne variait pas non plus, observation qui confirme celle de Nitschmann et Bohren (10) pour la caséine entière. Le pK moyen des groupes titrés est donc inférieur à 5 sinon on observerait une variation, plus grande que l'erreur expérimentale, du nombre de groupes titrés en fonction du pH. De même, et toujours compte tenu de la précision de nos mesures, l'absence de libération de protons à pH 3,2 indique une valeur de pK supérieure ou égale à 4. La valeur du pK moyen des groupes titrés est donc comprise entre 4 et 5. Une telle valeur ne correspond pas à la dissociation d'un groupe α aminé pour lequel on ne connaît pas de pK inférieur à 6 d'après Klotz (38), mais plutôt à la dissociation d'un groupe carboxyle dont le pK est au voisinage de 4 lorsque ce groupe est en position terminale ou sur une chaîne latérale d'une chaîne polypeptidique. On est ainsi conduit à penser que la présure coupe une liaison de type ester dans laquelle le groupe carboxylique est le groupement ionisable. D'après Jolles et *al.* (32) le

caséino-glycopeptide a les mêmes acides C terminaux que la caséine $\varkappa$; il est donc situé dans la partie C terminale de la caséine $\varkappa$. De plus, ces auteurs n'ont pas trouvé d'acide aminé N terminal, confirmant les résultats de WAKE (39) ; la liaison coupée par la présure peut donc être constituée par le groupement carboxylique C terminal de la paracaséine $\varkappa$ et une fonction non ionisée telle qu'une fonction alcool du caséino-glycopeptide (sucre, sérine ou thréonine).

Le nombre de protons mesurés à pH 6,95 en fin de réaction représente donc le nombre total de liaisons rompues par la présure. Ce nombre est faible puisqu'il correspond à $1 \pm 0{,}2$ N liaisons rompues pour 55 000 g de caséine $\varkappa$, N étant le nombre d'AVOGADRO. Ceci correspond à la rupture d'une liaison pour deux monomères de caséine $\varkappa$ soit un dimère sans que nous puissions expliquer pourquoi une liaison est rompue par dimère et non par monomère de caséine $\varkappa$. A pH neutre, d'après WAUGH et *al.* (24), la caséine $\varkappa$ est fortement polymérisée ($S_{20} = 13{,}6$ soit 16 à 37 monomères). Cependant, comme l'activité de la présure est à peu près la même, d'après ALAIS, MOCQUOT, NITSCHMANN et ZAHLER (5) dans des solutions de caséinate de sodium et dans le lait, on peut penser que le degré de polymérisation n'est pas un facteur limitant de la protéolyse, soit que la présure réagisse avec la forme monomère ou dimère en équilibre avec la forme polymère, soit que la polymérisation ne modifie pas le nombre de liaisons accessibles.

Comme il n'y a pas plus d'une liaison par molécule, la réaction s'accomplit sans qu'il puisse exister de produits intermédiaires. Il sera donc possible d'interpréter la cinétique en termes d'union entre l'enzyme et son substrat non attaqué et les constantes de MICHAELIS et de vitesse trouvées auront une signification bien définie.

Le nombre de protons libérés par hydrolyse de la caséine entière est particulièrement petit et il est difficile d'interpréter la variation de ce nombre en fonction du pH étant donné les interactions possibles entre les divers constituants de la caséine, intéractions dont nous verrons un exemple au chapitre V.

CHAPITRE IV

ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA PROTÉOLYSE DE LA CASÉINE KAPPA

Dans ce chapitre, nous suivrons la protéolyse de la caséine $\varkappa$ à différentes températures par la méthode titrimétrique à pH constant. Nous avons utilisé la présure cristallisée Hansen (§ 21), et les mesures ont été faites en milieu de force ionique constante (NaCl 0,1 M), la solution de caséine $\varkappa$ étant ajustée, pour chaque température, à pH 6,95 après réglage des potentiels d'asymétrie à l'aide d'un tampon phosphate pH 6,9 amené à cette même température. On n'a pas tenu compte du coefficient température du tampon qui est négligeable dans la zone de température où les expériences ont été faites. Le demi-dixième d'unité pH au-dessous de pH 7,0 a été choisi pour des raisons de commodité de lecture tenant à la position de l'aiguille du millivoltmètre du pHmètre.

Les solutions de caséine $\varkappa$ en milieu NaCl 0,1 M sont stables pendant au moins 24 heures. Toutefois nous avons préparé chaque jour les solutions nécessaires à la série d'expériences de la journée ; ces solutions étaient additionnées de toluène à raison d'une goutte pour 5 ml.

41. — Variation des vitesses de protéolyse avec la concentration en présure

Nous avons préparé une gamme de dilutions dans l'eau distillée de la même solution stock de présure (§ 21) et étudié la variation des vitesses initiales en fonction de ces dilutions exprimées en unités présure ml d'après le titre de la solution stock. Les solutions diluées de présure ne sont pas stables : le titre d'une solution de 1,5 U. P. ml baisse de 5 p. 100 en 4 h et de 7 p. 100 en 11 h à + 5°C à l'obscurité. Aussi, nous avons préparé extemporanément les dilutions de présure et nous les avons laissées 10 mn seulement à la température de l'expérience avant de les ajouter à la caséine $\varkappa$.

Les figures 14 et 15 représentent l'évolution de la réaction à 25 et 35°C respectivement. Sur les figures 16 et 17 nous avons alors porté les vitesses initiales, v_0, obtenues en fonction de la concentration en présure du mélange en réaction aux deux températures. Les vitesses sont mesurées à $\pm$ 10 p. 100 près et dans certains cas, une dérive non négligeable ayant été observée avant l'addition d'enzyme, il en a été tenu compte dans la mesure de la vitesse.

Les erreurs expérimentales ont été indiquées sur chacun des graphiques (fig 16 et 17). On voit qu'il y a proportionnalité entre la vitesse initiale et la concentration en présure, sauf peut-être pour 70.10^{-3} U. P./ml à 35°C où la vitesse observée est trop faible. Cependant, pour de telles concentrations en présure, les vitesses initiales

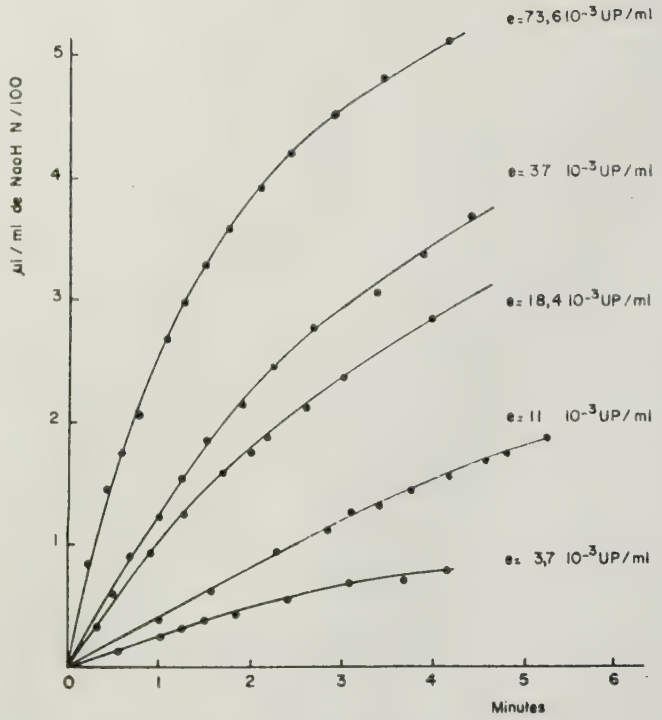

FIG. 14. — *Cinétique de protéolyse de la caséine* $\varkappa$ *suivie par titrimétrie à* pH *constant. Différentes concentrations en présure ; température* 25°C.

En ordonnées : nombre de µl de soude N/100 ajoutés à 1 ml d'hydrolysat pour maintenir le pH constant (1µl de NaOH N/100 correspond à 10^{-8} mole de H^+ libérés) ;
En abscisses : temps écoulé depuis l'addition de la présure.
Concentration en caséine $\varkappa$: 3,9 mg/ml, NaCl 0,1 M, pH 6,95.

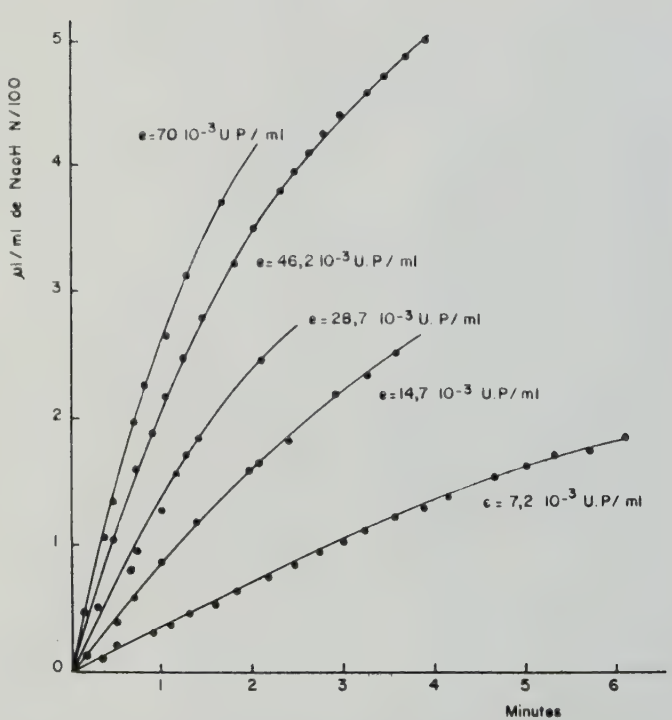

FIG. 15. – *Cinétique de protéolyse de la caséine* $\varkappa$ *suivie par titrimétrie à* pH *constant. Différentes concentrations en présure ; température* 35°C.

En ordonnées : nombre de µl de soude N/100 ajoutés à 1 ml d'hydrolysat pour maintenir le pH constant ;
En abscisses : temps écoulé depuis l'addition de la présure.
Concentration en caséine $\varkappa$: 4,17 mg/ml, NaCl 0,1 M, pH 6,95.

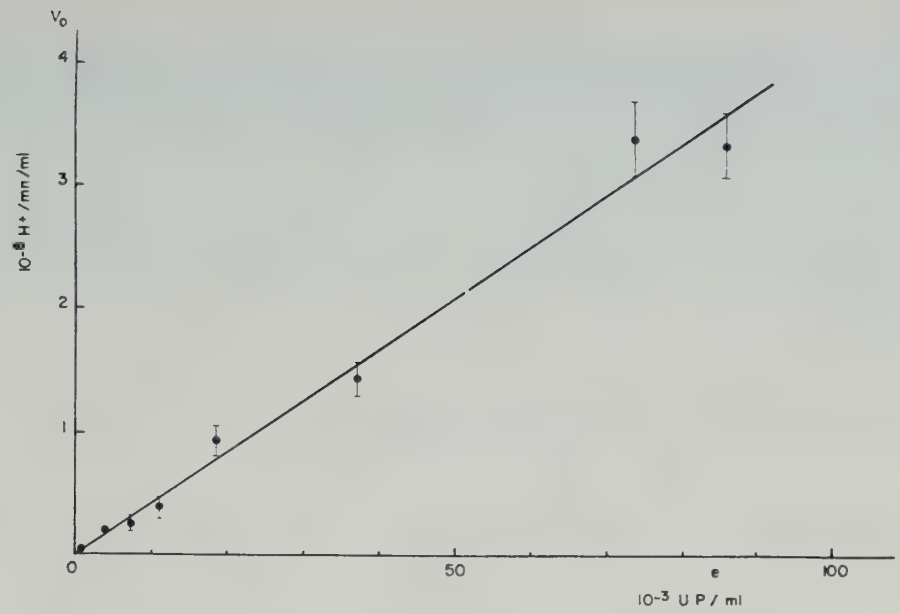

FIG. 16. — *Variation des vitesses initiales en fonction de la concentration en présure à* 25°C
En abscisses : concentration en présure (U. P./ml) ;
En ordonnées : vitesse initiale, v_0, de protéolyse exprimée en mole de H^+ libérés $mn^{-1}.ml^{-1}.10^8$.
Concentration en caséine $\varkappa$: 3,9 mg/ml, NaCl 0,1 M, pH 6,95.

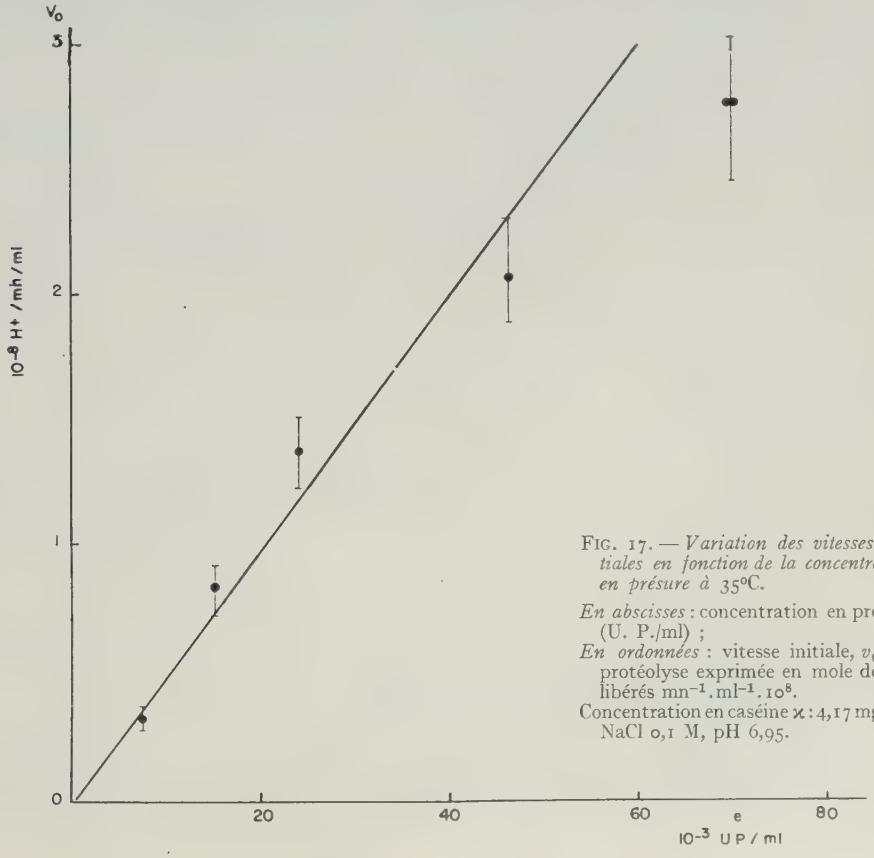

FIG. 17. — *Variation des vitesses initiales en fonction de la concentration en présure à* 35°C.
En abscisses : concentration en présure (U. P./ml) ;
En ordonnées : vitesse initiale, v_0, de protéolyse exprimée en mole de H^+ libérés $mn^{-1}.ml^{-1}.10^8$.
Concentration en caséine $\varkappa$: 4,17 mg/ml, NaCl 0,1 M, pH 6,95.

sont grandes et imprécises car leur mesure doit se faire pendant la première minute de la protéolyse, période au cours de laquelle l'addition de l'enzyme à la solution provoque une perturbation qui dure environ une minute et qui n'est pas très reproductible d'un essai à l'autre.

Nous pouvons donc, dans la zone des concentrations en enzyme étudiée appliquer la relation de V. HENRI-MICHAELIS où $v = \frac{k_s s}{K_m + s} e$ (§ 11) et suivre les variations des vitesses initiales, v_0, en fonction de la concentration en substrat, s_0, à différentes températures.

42. — Variation des vitesses de protéolyse avec la concentration en substrat à différentes températures

Lorsque la concentration en caséine x varie de 0,6 à 19 mg/ml la vitesse initiale de la réaction augmente et nous n'avons pas observé d'inhibition par excès de substrat. Les résultats ont été représentés selon la relation $v_0 = f(v_0/s_0)$ et nous avons déterminé la constante de MICHAELIS qui est la pente de la droite ainsi obtenue et la

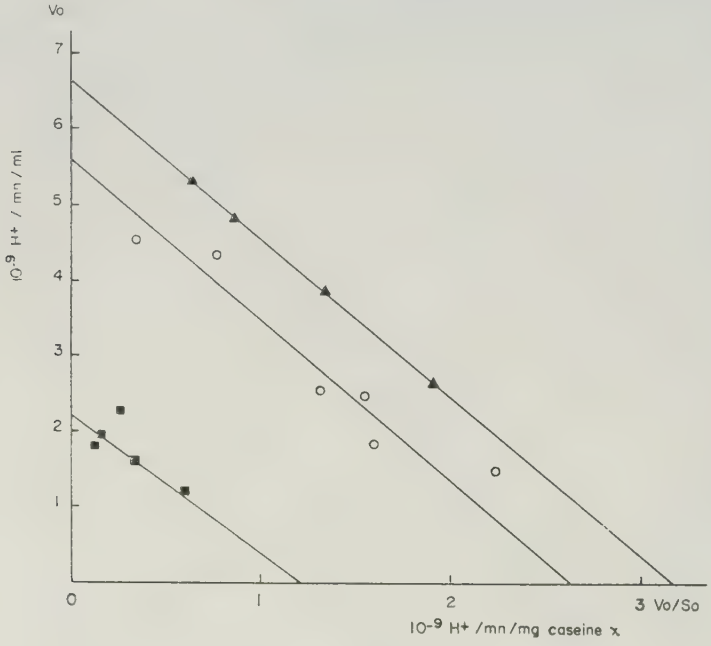

FIG. 18. — *Détermination de la constante de* MICHAELIS *à 25°C à différentes concentrations de présure.*

En abscisses : Rapport v_0/s_0 exprimé en $H^+.mn^{-1}.mg^{-1}$;
En ordonnées : vitesse initiale v_0 exprimée en $H^+.mn^{-1}.ml^{-1}$.
Concentration en présure :
■ $e = 4{,}6.10^{-3}$ U.P./ml,
o $e = 10{,}7.10^{-3}$ U.P./ml,
▲ $e = 18.10^{-3}$ U.P./ml.
pH 6,95 NaCl 0,1 M.

vitesse maximum, proportionnelle à la constante de vitesse du complexe intermédiaire, qui est l'ordonnée à l'origine. Ces déterminations ont été faites à trois températures : 25, 35 et 40°C, avec différentes concentrations en enzyme.

421. — Résultats expérimentaux

Ils ont été reportés sur les figures 18, 19 et 20. Les résultats obtenus à 35°C pour les concentrations en présure supérieures ou égales à 10.10^{-3} U. P./ml (figure 19)

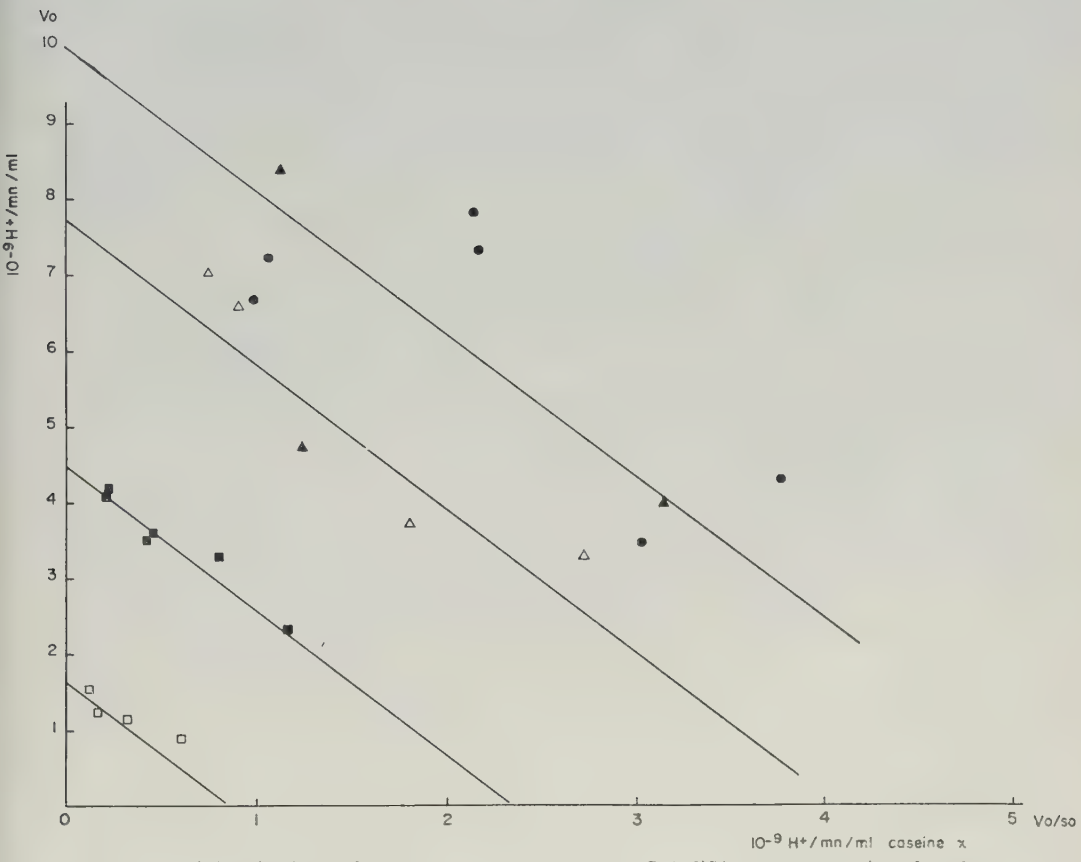

Fig. 19. — *Détermination de la constante de* Michaelis *à* 35°C *à différentes concentrations de présure.*
En abscisses : Rapport v_0/s_0 exprimé en $H^+ \cdot mn^{-1} \cdot mg^{-1}$;
En ordonnées : vitesses initiales v_0 exprimées en $H^+ \cdot mn^{-1}$. ml^{-1}.
Concentrations en présure :
□ $e = 2{,}6.10^{-3}$ U.P./ml,
■ $e = 6{,}6.10^{-3}$ U.P./ml,
▲ $e = 11{,}8.10^{-3}$ U.P./ml,
▲ $e = 13{,}5.10^{-3}$ U.P./ml,
● $e = 14{,}3.10^{-3}$ U.P./ml.
pH 6,95, NaCl 0,1 M.

sont assez dispersés pour une raison semblable à celle déjà signalée et aussi parce que la réaction étant très rapide la vitesse ne reste constante que pendant très peu de temps, la mesure de cette vitesse ne repose que sur quelques déterminations et elle demeure par suite assez imprécise. Les moyennes des valeurs expérimentales K_m

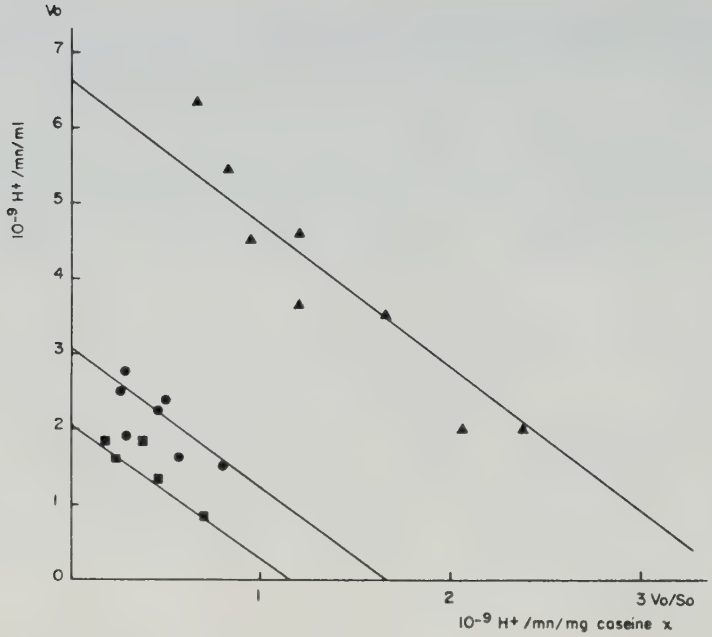

FIG. 20. — *Détermination de la constante de* MICHAELIS *à* 40°C *à différentes concentrations de présure.*
En abscisses : Rapport v_0/s_0 exprimé en $H^+.mn^{-1}.mg^{-1}$;
En ordonnées : vitesses initiales v_0 exprimées en $H^+.mn^{-1}.ml^{-1}$.
Concentrations en présure :
■ $e = 2{,}7.10^{-3}$ U.P./ml,
● $e = 4{,}1.10^{-3}$ U.P./ml,
▲ $e = 8{,}2.10^{-3}$ U.P./ml.
pH 6,95, NaCl 0,1 M.

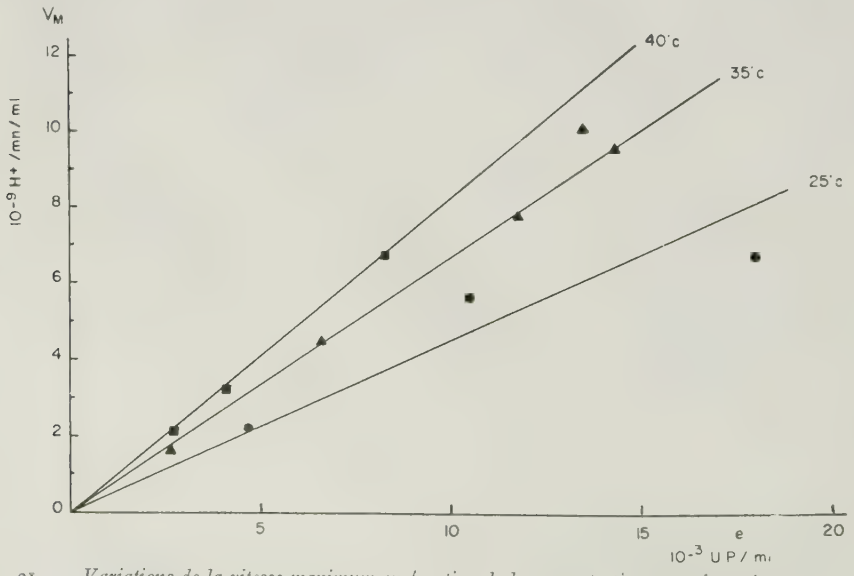

FIG. 21. — *Variations de la vitesse maximum en fonction de la concentration en présure à* 25, 35 *et* 40°C.
En abscisses : concentration de la présure exprimée en U.P./ml ;
En ordonnées : vitesse maximum exprimée en $H^+.mn^{-1}.ml^{-1}$.

pour chaque température ainsi que les écarts maximums observés ont été reportés dans le tableau 5. Dans la limite des erreurs expérimentales, la constante de MICHAELIS ne varie pas entre 25 et 40°C et sa valeur moyenne est de **1,8 ± 0,2 mg/ml.**

TABLEAU 5

Valeurs de K_m et de k_s à différentes températures

Température °C	25	35	40
$V_M/e\ 10^{-7}$ H^+/mn/ml/U.P./ml	4,6 ± 0,6	6,6 ± 0,7	8,4 ± 0,3
k_s (1) s^{-1}	25 ± 3	36 ± 4	46 ± 2
K_m mg/ml	1,98 ± 0,3	1,55 ± 0,4	1,84 0,03
K_m $\frac{M}{10^5}$	3,6 0,5	2,8 ± 0,7	3,3 - 0,05

(1) Valeur calculée sur la base d'un H^+ libéré par unité cinétique et de $3 \cdot 10^{-10}$ mole de présure par unité présure.

Dans la figure 21, nous avons représenté la vitesse maximum en fonction de la concentration en présure aux trois températures étudiées. C'est une droite dont la pente correspond à la constante de vitesse de décomposition du complexe enzyme-substrat. La valeur de la pente à différentes températures a été reportée dans le tableau 5 et exprimée sous deux formes : l'une en unités arbitraires, l'autre en secondes^{-1}. Sous cette dernière forme elle représente le nombre de liaisons esters rompues par seconde par une molécule d'enzyme, nombre calculé sur la base de $3 \cdot 10^{10}$ mole de présure par unité présure et d'un proton libéré par liaison rompue.

422. — ÉQUIVALENCE DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS ET DE LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DU COMPLEXE PRÉSURE-CASÉINE $\varkappa$

Nous avons indiqué que la constante de MICHAELIS K_m est égale à $\frac{k'_1 + k_s}{k_1}$ (§ 11) et nos résultats montrent qu'elle ne varie pas entre 25 et 40°C. Dans ce même intervalle de température, k_s varie d'un facteur deux (tableau 5). Il est peu probable que les variations de $\frac{k'_1}{k_1}$ compensent exactement celles de $\frac{k_s}{k_1}$ mais il est beaucoup plus probable que k_s peut être considéré comme négligeable devant k'_1 et que, pratiquement, la constante de MICHAELIS K_m est peu différente de la constante de dissociation du complexe présure-caséine $\varkappa$ c'est-à-dire $\frac{k'_1}{k_1}$. Par conséquent, la concentration du complexe intermédiaire (ES) est celle qui résulte de l'équilibre $E + S \rightleftarrows ES$ et l'hypothèse d'HENRI se trouve vérifiée comme c'est le cas dans presque toutes les hydrolyses enzymatiques.

423. — Énergétique de la formation du complexe présure-caséine $\varkappa$

Dans l'hypothèse d'une réaction entre la présure et un dimère de la caséine $\varkappa$, hypothèse dont nous avons déjà parlé (§ 344) et que nous discuterons encore plus loin, nous obtenons les valeurs thermodynamiques suivantes pour la formation du complexe intermédiaire d'après la relation

$$\Delta F = - RT \log_e 1/K_m$$

à 35°C :

$$\Delta F = - 6\,300 \pm 100 \text{ calories/mole}$$
$$\Delta H = 0$$
$$\Delta S = + 20 \text{ calories/degré/mole}$$

43. — Variation des vitesses de protéolyse avec la température : énergie d'activation

Les mesures ont été faites sur des solutions de caséine $\varkappa$ à 3,9 mg ml pour deux concentrations d'enzyme, dans l'intervalle de température 20-40°C. La figure 22

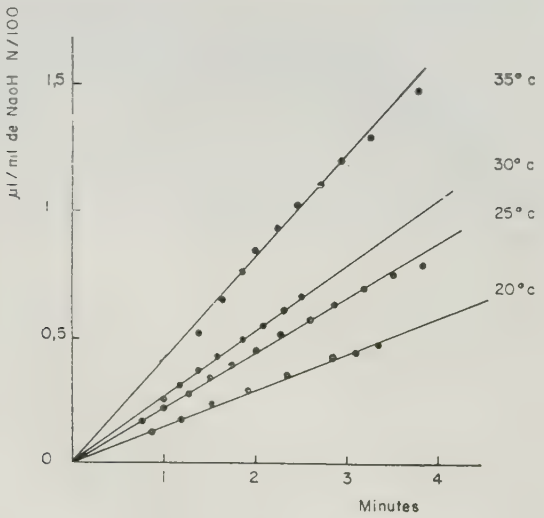

Fig. 22. — *Cinétique de protéolyse de la caséine $\varkappa$ à différentes températures en* NaCl 0,1 M, pH 6,95.
En abscisses : temps en minutes écoulé depuis l'addition de la présure ;
En ordonnées : nombre de µl de NaOH N/100 versés par ml d'hydrolysat pour maintenir le pH constant.
Concentration en caséine $\varkappa$: 3,9 mg/ml ;
Concentration en présure $e = 7{,}1 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml.

montre une cinétique de protéolyse à 20, 25, 30 et 35°C et nous avons représenté, dans la figure 23 courbe 1, pour plusieurs séries d'essais, la droite $\log_{10} v_0$ e en fonction de 1 T où v_0 représente la vitesse initiale et e la concentration en présure. Comme la constante de Michaelis ne varie pas avec la température, d'après ce que

nous avons vu (§ 132 équation (10)) la pente de cette droite est proportionnelle à l'incrément critique μ ou énergie d'activation expérimentale de la réaction de décomposition du complexe intermédiaire en enzyme et produits de la réaction. Nous avons trouvé $\mu = 6\,900 \pm 400$ **calories/mole.** La courbe (2) de la figure 23 représente la droite obtenue en remplaçant la valeur de la vitesse initiale par celle de la vitesse maximum, V_M, dans l'expression $\log_{10} v_0/e$ et où $V_M/e = k_s$. Dans les deux cas nous trouvons bien la même valeur d'incrément critique $\mu = 6\,900 \pm 400$ calories/mole.

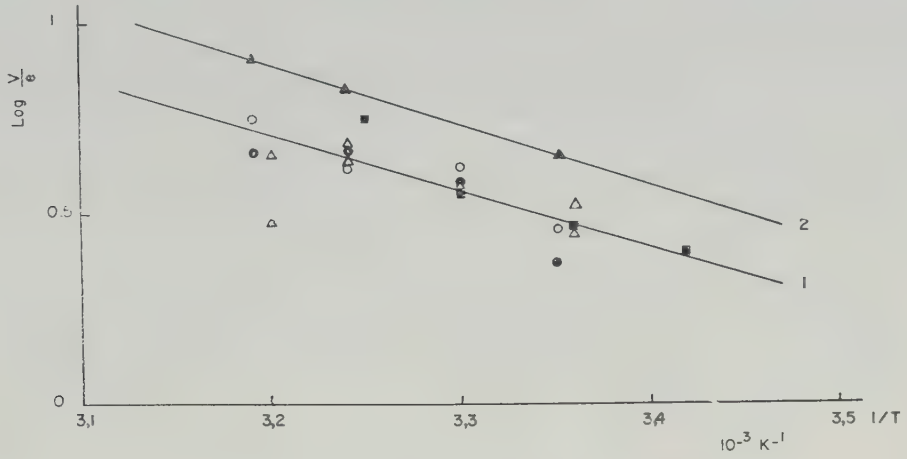

FIG. 23. — *Variation de la vitesse en fonction de la température.*

Courbe 1 : variation de la vitesse initiale : caséine $\varkappa$: $s = 3{,}9$ mg/ml ;
Concentration en présure :
- ○ $e = 3{,}6.10^{-3}$ U.P./ml,
- △ $e = 3{,}8.10^{-3}$ U.P./ml,
- ■ $e = 7{,}1.10^{-3}$ U.P./ml,
- ● $e = 7{,}2.10^{-3}$ U.P./ml.

Courbe 2 : variation de la constante de vitesse k_s.
En abscisses : inverse de la température absolue exprimée en degrés Kelvin ;
En ordonnées : logarithme décimal du rapport v_0/e exprimé en H+/mn/U.P..10^7.
Dans la courbe 2 on a suivi la variation du logarithme décimal de la vitesse maximum par unité présure exprimée en H+/mn/U.P..10^7.
pH 6,95, NaCl 0,1 M.

44. — Discussion

441. — Constante de Michaelis

Nous avons déjà indiqué, au chapitre précédent, (§ 344) que la caséine $\varkappa$ est fortement polymérisée à pH 7 alors que la protéolyse ne semble pas être sensible au degré de polymérisation, soit que la polymérisation ne modifie pas le nombre de liaisons esters accessibles, soit que l'équilibre polymère $\rightleftarrows$ dimère s'établisse avec une rapidité suffisante pour ne pas influencer la cinétique de la protéolyse. Cette dernière hypothèse paraît la plus vraisemblable si l'on admet, avec Waugh (12 et 24) que les hauts polymères de la caséine entière, représentés par les micelles, sont eux-mêmes en équilibre réversible avec de petits polymères dont la taille exacte n'est pas précisée par cet auteur. Sur cette base nous pouvons alors exprimer la constante de Michaelis par

rapport à l'unité cinétique que constitue le dimère (§ 344) et $K_m = 3{,}3 \pm 0{,}3 . 10^{-5}$ M. Ceci présente également l'avantage de donner pour K_m la même valeur au cas où la caséine $\varkappa$ ne serait pas homogène et ne contiendrait que 50 p. 100 du véritable substrat de la présure. En effet dans cette hypothèse la vraie valeur de K_m serait la moitié de celle mesurée mais il y aurait 1 liaison rompue par monomère et non plus par dimère si bien que la valeur de K_m exprimée en mole par litre ne changerait pas. Cependant une telle hétérogénéité des préparations de caséine $\varkappa$ n'a pas été vérifiée jusqu'à maintenant.

Des valeurs de K_m du même ordre de grandeur ont déjà été trouvées pour différentes hydrolyses de protéines; nous citerons par exemple l'hydrolyse de la β-lactoglobuline à pH 7 par la trypsine ($K_m = 1{,}7 . 10^{-4}$ M (40)) ou par la chymotrypsine ($K_m = 3{,}7 . 10^{-5}$ M (41)) et également d'autres hydrolyses telles que celle de l'acéthylcholine par l'acétylcholinestérase ($K_m = 4{,}2 . 10^{-4}$ M (42)). Dans certains cas, la valeur de K_m pour l'hydrolyse d'une liaison ester est plus faible que pour l'hydrolyse d'une liaison amide. Par exemple l'hydrolyse par la trypsine du benzoyl-L-arginine méthylester donne $K_m = 8 . 10^{-5}$ M (43) et du benzoyl-L-arginine amide $K_m = 21 . 10^{-4}$ M (44).

L'assimilation possible de la constante de Michaelis à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat est un fait d'observation pour de nombreuses protéolyses en particulier pour l'hydrolyse de la β-lactoglobuline par la trypsine et la chymotrypsine (40 et 41). L'inverse de cette constante représente alors l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

La chaleur de formation (ΔH) du complexe présure-caséine $\varkappa$ étant nulle, toute la variation d'énergie libre est liée à une variation positive d'entropie $\Delta S = + 20$ U. E. La formation du complexe présure-caséine $\varkappa$ est donc accompagnée d'un remaniement intramoléculaire important et la liaison est faible ($\Delta H = 0$, $\Delta F = -6300$ cal./mole). Ce remaniement intramoléculaire peut se faire soit par départ d'un grand nombre de molécules d'eau, soit par désorganisation partielle du substrat ou de l'enzyme : la valeur négative de la variation de l'entropie d'activation (cf. § 443) indique le retour à un état plus organisé du substrat ou de l'enzyme.

442. — Constante de vitesse de décomposition du complexe présure-caséine $\varkappa$

Nous avons trouvé pour k_s à 35°C la valeur de 36 s^{-1}. Elle est relativement élevée, environ deux cents fois plus grande que celle déterminée pour l'hydrolyse de la β-lactoglobuline par la trypsine où $k_s = 0{,}15$ s^{-1} (40). Cette valeur correspond au fait expérimentalement bien connu que la réaction de coagulation peut être très rapide ou encore que de très petites quantités d'enzyme sont suffisantes pour obtenir la coagulation contrairement aux quantités importantes nécessaires à une hydrolyse complète (cf. Introduction). Des valeurs élevées de k_s sont également observées lors de l'hydrolyse des liaisons esters. Par exemple l'hydrolyse par la chymotrypsine du benzoyl-L-phénylalanine méthylester conduit à une valeur de $k_s = 51$ s^{-1} et l'acétyl-L-tyrosine éthylester à une valeur de $k_s = 193$ s^{-1} (45).

443. — Variation d'énergie libre, d'entropie et d'enthalpie d'activation

A partir de la valeur de l'incrément critique μ et de la constante de vitesse k_s nous avons calculé, d'après les relations déjà mentionnées (§ 132), les variations d'énergie libre ΔF^*, d'enthalpie ΔH^* et d'entropie ΔS^* d'activation. Ces valeurs ont été réunies dans le tableau 6. La variation d'enthalpie est faible, c'est la diminution d'entropie qui apporte la part la plus importante à l'augmentation d'énergie libre.

TABLEAU 6

Valeurs thermodynamiques correspondant à l'activation du complexe intermédiaire présure-caséine $\varkappa$ à 35°C

k_s	s^{-1}	36 ± 4
ΔF^*	calories/mole	+ 15 800 ± 100
μ	calories/mole	+ 6 900 ± 400
ΔH^*	calories/mole	+ 6 300 ± 400
ΔS^*	calories/degré/mole.	— 31 ± 1,5

De faibles valeurs de ΔH^* sont souvent observées pour l'hydrolyse des liaisons esters, nous citerons les valeurs de 11 900 et 10 900 cal./mole trouvées respectivement pour l'hydrolyse par la chymotrypsine du benzoyl-L-phénylalanine méthylester et de l'acétyl-L-tyrosine éthylester (45).

CHAPITRE V

ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA PROTÉOLYSE DE LA CASÉINE $\varkappa$ EN PRÉSENCE DE CASÉINE α_s

Nous avons vu que la paracaséine $\varkappa$ forme des fibrilles qui précipitent dans des solutions à pH neutre ne contenant pas d'ions divalents. Or une solution de caséinate de sodium, qui contient par conséquent la caséine $\varkappa$, reste parfaitement limpide au cours de l'action de la présure. Pour tenter d'expliquer cette différence de comportement, nous avons ajouté des quantités croissantes de caséine entière à une solution de caséine $\varkappa$: la formation de fibrilles de paracaséine $\varkappa$ est d'abord retardée, puis complètement inhibée. Ce sont la caséine β et la caséine α_s qui, parmi les différents constituants de la caséine entière, inhibent cette formation de fibrilles. Contrairement à ce que nous trouverons pour la caséine α_s, la caséine β est attaquée par la présure. Il se produit une protéolyse du type protéolyse secondaire d'après NITSCHMANN et KELLER (37) et nous avons nous-mêmes observé une libération de protons à partir d'une solution de caséine β. C'est pourquoi nous n'avons pas effectué de mesures en présence de caséine β, afin de ne pas compliquer à priori l'interprétation de nos résultats, et nous nous sommes bornés à étudier l'action de la caséine α_s.

51. — Action de la présure sur la caséine α_s

Cette action a été suivie à la fois par la mesure des protons libérés à pH 6,95 et par la méthode de précipitation trichloracétique. Aucune libération de protons, ni de caséino-glycopeptide, n'a été observée. Il est seulement possible de mettre en évidence une très faible activité de la présure par détermination de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 (fig. 24). Cette activité résiduelle peut s'expliquer, soit par une faible contamination de la préparation par la caséine β, contamination ne donnant pas lieu à une libération de protons, soit par une sensibilité propre de la caséine α_s à la présure sous forme de protéolyse secondaire.

Ce qui est important, c'est que la caséine α_s ne libère aucun proton qui puisse interférer avec la mesure de ceux libérés à partir de la caséine $\varkappa$.

52. — Action inhibitrice de la caséine α_s. Comparaison entre la méthode de mesure des protons libérés et la méthode de précipitation trichloracétique

L'action inhibitrice de la caséine α_s sur la précipitation de la caséine $\varkappa$ par la présure se marque aussi par une diminution du nombre de protons libérés (cf. fig. 25) comme si cette réaction était inhibée.

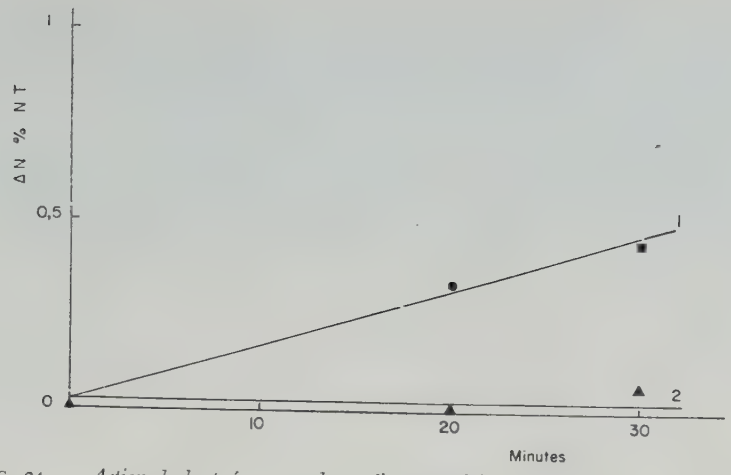

FIG. 24. — *Action de la présure sur la caséine α_s suivie par la méthode trichloracétique.*
Courbe 1 : Azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100 ;
Courbe 2 : Azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 (caséino-glycopeptide).
En abscisses : temps d'action de la présure en minutes ;
En ordonnées : augmentation de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique en pourcent de l'azote total, blanc déduit (0,37 p. 100 à 2 p. 100 de T. C. A. et 0,33 à 12 p. 100 de T. C. A.).
Concentration en caséine α_s : $s = 8{,}5$ mg/ml.
Concentration en présure : $e = 0{,}108$ U.P./ml.
Température : 35°C.
pH 6,95, NaCl 0,1 M.

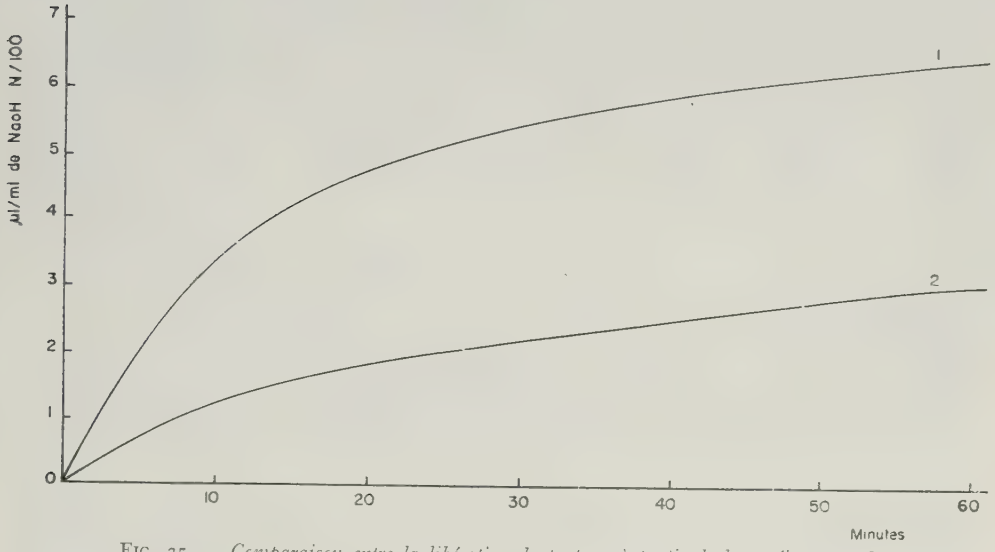

FIG. 25. — *Comparaison entre la libération de protons à partir de la caséine $\varkappa$ seule et de la caséine $\varkappa$ additionnée de caséine α_s.*
Courbe 1 : caséine $\varkappa$ seule : 4,7 mg/ml ;
Courbe 2 : caséine $\varkappa$: 4,7 mg/ml ;
caséine α_s : 4 mg/ml ;
Concentration en présure : $8{,}5 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml (0,1 γ/ml) ;
Température : 40,2°C ;
pH 6,95, NaCl 0,1 M.
En abscisses : temps écoulé depuis l'addition de la présure en minutes ;
En ordonnées : protons libérés en μl de NaOH N/100 par ml d'hydrolysat (1 μl de NaOH N/100 = 10^{-8} H^+).

Par contre la libération du caséino-glycopeptide mise en évidence par détermination de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 (§ 31) n'est pas modifiée par la présence de la caséine α_s (fig. 26). Ce fait se produit également lorsqu'on ajoute à la caséine $\varkappa$, la caséine entière au lieu de la caséine α_s.

En laissant en contact pendant un temps plus ou moins long la caséine $\varkappa$ et la caséine α_s d'une part, la présure et la caséine α_s d'autre part, nous n'avons pas observé de différence dans le degré d'inhibition. Cette inhibition est donc immédiate, ou tout au moins plus rapide que la combinaison de la présure avec la caséine $\varkappa$.

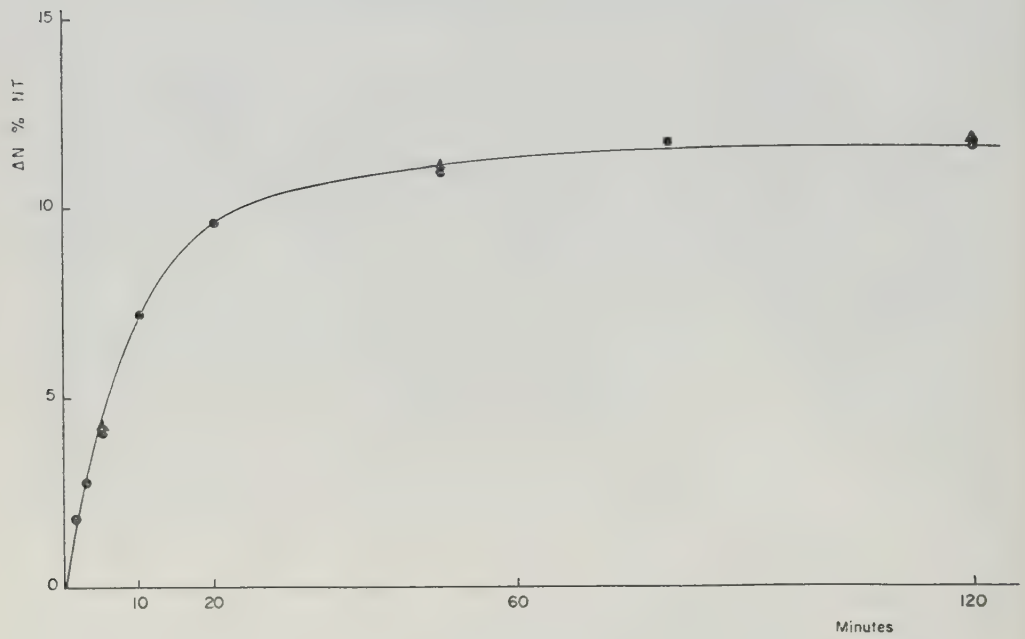

FIG. 26. — *Comparaison entre la libération du caséino-glycopeptide à partir de la caséine $\varkappa$ seule et de la caséine $\varkappa$ additionnée de caséine α_s.*

● caséine $\varkappa$ seule : 5 mg/ml,
▲ caséine $\varkappa$: 5 mg/ml et caséine α_s : 4 mg/ml ;
Concentration en présure : $8{,}5.10^{-3}$ U.P./ml (0,1 γ/ml) ;
Température : 40,2°C, pH 6,95, NaCl 0,1 M.
En abscisses : temps écoulé depuis l'addition de présure en minutes.
En ordonnées : augmentation de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100, déduction faite de l'azote soluble au temps zéro (0,55 p. 100 N. T.) et exprimé en pourcent de l'azote de la caséine $\varkappa$.

La présence de caséine α_s sous forme d'impureté dans la préparation de caséine $\varkappa$ pourrait être une cause d'erreur dans la mesure du nombre total de liaisons rompues. Or, les électrophorèses sur gel d'amidon, en solution d'urée concentrée effectuées par RIBADEAU DUMAS selon la technique de WAKE et BALDWIN (46), montrent que la teneur de la caséine $\varkappa$ en caséine α_s est certainement inférieure à 5 p. 100. Aussi, afin d'apprécier l'influence éventuelle d'une telle proportion d'impureté nous avons ajouté, à la caséine $\varkappa$, 5 p. 100 de caséine α_s et nous avons observé que, dans nos conditions expérimentales, ni le nombre total de H^+ libérés, ni les vitesses initiales ne s'en trouvaient modifiés.

53. — Influence du pH sur l'inhibition.

Alors que l'influence du pH sur la protéolyse de la caséine $\varkappa$ seule est facilement interprétable, il n'en est plus de même lorsque la caséine α_s est ajoutée à la caséine $\varkappa$ (fig. 27). Nous avions déjà éprouvé une difficulté analogue avec la caséine entière (fig. 10). Sans vouloir expliquer le comportement de la caséine entière, mélange très

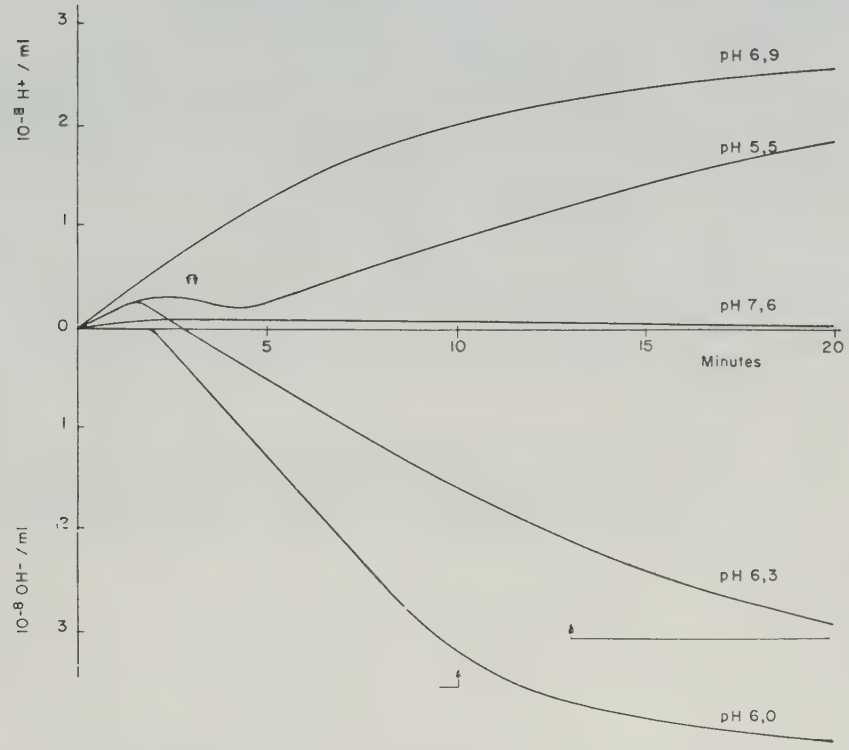

FIG. 27. — *Influence du* pH *sur le nombre de protons libérés à partir de la caséine* $\varkappa$ *additionnée de caséine* α_s.
Concentration en caséine $\varkappa$: 4 mg/ml, ;
Concentration en caséine α_s : 2 mg/ml ;
Concentration en présure : 10.10^{-3} U.P./ml (0,12 γ/ml) ;
Température : 35,3°C.
En abscisses : temps écoulé depuis l'addition de la présure ;
En ordonnées : mole de H^+ ou de OH^- libérés par ml d'hydrolysat.
↓ début ou fin de précipitation.

complexe (46), l'effet de la seule addition de caséine α_s à la caséine $\varkappa$ nous semble difficile à expliquer de façon satisfaisante. Nous pouvons remarquer que, dans les conditions expérimentales de la figure 27, si la précipitation de la caséine $\varkappa$ n'a plus lieu à pH 7,6 elle se produit néanmoins au bout de 4 h à pH 6,9 et au bout d'un temps plus court pour des pH plus bas. On peut alors penser que l'association de la caséine α_s avec la caséine $\varkappa$, dont nous discuterons plus loin la possibilité, doit dépendre beaucoup du pH dans les conditions où nous nous sommes placés : à pH 7,6 il n'y aurait plus de caséine $\varkappa$ non combinée à la caséine α_s.

54. — Étude du mécanisme de l'inhibition

A la suite des travaux de Waugh (24) il est admis que la caséine $\varkappa$ et la caséine α_s forment entre elles, à pH neutre, un complexe de constante de sédimentation $S_{20} = 7{,}5$ en équilibre réversible avec chacun des constituants. Nous pouvons donc admettre à priori que l'inhibition observée résulte de la formation de ce complexe. Pour expliquer cette inhibition, nous sommes conduits à formuler l'alternative suivante : ou bien l'hydrolyse ne se fait plus et la réaction enzymatique est inhibée, ou bien l'hydrolyse a toujours lieu mais sans qu'elle s'accompagne de libération de protons. Comme la libération du caséino-glycopeptide n'est pas modifiée et comme nous avons conclu (§ 344) à l'identité entre cette réaction et celle conduisant à la libération des protons, c'est le deuxième terme de l'alternative qui nous semble le plus vraisemblable. On peut l'expliquer en supposant que l'union entre la caséine $\varkappa$ et la caséine α_s entraîne une modification du pK du groupe carboxylique provenant de la coupure de la liaison ester, modification telle que ce groupe n'est plus titrable à pH 6,9.

Avant d'examiner les résultats expérimentaux et de les interpréter nous étudierons d'abord les conséquences qu'auraient sur le plan de la cinétique de l'hydrolyse : *a*) l'inhibition de la réaction enzymatique elle-même ; *b*) la rétrogradation de l'ionisation du groupe carboxylique.

541. — Inhibition de la réaction enzymatique

5411. — *Cas général.*

Ayant observé que l'inhibition était supprimée pour de fortes concentrations en caséine $\varkappa$ nous envisagerons seulement le cas de l'inhibition compétitive.

Le schéma des réactions entre la caséine $\varkappa$, S, la présure, E, et la caséine α_s, α_s correspond alors aux équilibres suivants :

$$\text{(1)} \qquad E + S \underset{k'_1}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} (ES) \overset{k_s}{\rightarrow} E + P \text{ (cf. § 11)}$$

$$\text{(2)} \qquad S + n\,\alpha_s \rightleftharpoons S\,(\alpha_s)_n$$

$$\text{(3)} \qquad \text{avec } K\alpha_s = \frac{(S)\,(\alpha_s)^n}{(S(\alpha_s)_n)}$$

en faisant l'hypothèse que la fixation de n molécules de caséine α_s sur une molécule de caséine $\varkappa$ inhibe la formation du complexe enzyme-substrat. (S), (α_s) et $(S(\alpha_s)_n)$ représentent respectivement les concentrations assimilées aux activités de la caséine $\varkappa$ libre, de la caséine α_s libre et du complexe caséine α_s-caséine $\varkappa$.

Si l'état stationnaire est réalisé et si la concentration de la caséine $\varkappa$ combinée sous forme de complexe (ES) est toujours négligeable il suffit de remplacer dans l'expression de la vitesse sans inhibiteur (§ 11) s par sa nouvelle valeur :

$$(S) = \frac{s}{1 + \dfrac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}}}$$

et l'on trouve pour la vitesse v_{α_s} en présence de caséine α_s :

$$\text{(4)} \qquad v_{\alpha_s} = \frac{k_s e s}{K_m \left| 1 + \dfrac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}} \right| + s}$$

La vitesse maximum $k_s e$ n'est pas modifiée, seule la constante de Michaelis devient :

$$K'_m = K_m \left[1 + \frac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}} \right].$$

Remarquons que, sans inhibiteur, la vitesse, v, étant de la forme $v = \frac{k_s e s}{K_m + s}$ (§ 11) le rapport $\alpha = \frac{v_{\alpha_s}}{v}$ est égal à :

$$\frac{K_m + s}{K_m \left[1 + \frac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}} \right] + s}$$

que nous pouvons écrire sous la forme :

$$(5) \qquad \frac{\alpha}{1 - \alpha} = \frac{K_m + s}{K_m} \times K_{\alpha_s} \times \frac{1}{(\alpha_s)^n}.$$

Si l'on porte le logarithme de $\frac{\alpha}{1 - \alpha}$ en fonction du logarithme de la concentration en caséine α_s libre, la pente de la droite obtenue sera égale à $-n$ et l'ordonnée à l'origine à $\log K\alpha_s + \log \frac{K_m + s}{K_m}$, cette dernière expression dépend de la concentration en caséine $\varkappa$.

5412. — *Cas particuliers.*

Nous ne considérerons dans les applications expérimentales que les vitesses initiales $v_{0\alpha_s}$ mesurées pour les concentrations initiales s_0 de caséine $\varkappa$.

Si $(\alpha_s)^n$ est très petit devant $K\alpha_s$ on n'observe plus d'inhibition. Cela se réalise d'autant plus vite que n est plus grand, (α_s) étant inférieur à l'unité, et par conséquent lorsque la caséine $\varkappa$ peut fixer plusieurs molécules de caséine α_s. Si la concentration de la caséine α_s est très grande par rapport à celle de la caséine $\varkappa$ on peut alors confondre la concentration de la caséine α_s libre avec la concentration de la caséine α_s totale et si celle-ci est maintenue constante, l'inhibition est du type compétitif. Enfin si la concentration en caséine α_s est de l'ordre de celle de la caséine $\varkappa$, la valeur de K_m varie avec chaque valeur de s et la variation de la vitesse initiale $v_{0\alpha_s}$ en fonction du rapport, $v_{0\alpha_s}/s_0$, de la vitesse initiale à la concentration initiale en caséine $\varkappa$ totale, n'est plus linéaire.

542. — Rétrogradation de l'ionisation du groupe carboxylique

5421. — *Cas général.*

Nous admettons que le groupe carboxylique de la liaison ester coupée par la présure n'est pas titrable à pH 6,9 quand la caséine α_s est combinée à la caséine $\varkappa$.

Nous avons vu plus haut que l'étude cinétique à différents pH ne permet pas de vérifier cette hypothèse, (en déterminant par exemple le nouveau pK), parce que d'autres phénomènes dépendant du pH interviennent, en particulier l'association caséine $\varkappa$-caséine α_s. Cependant, en ajoutant suffisamment de caséine α_s, c'est-à-dire

en saturant la caséine $\varkappa$ de caséine α_s, on ne mesure plus qu'un très petit nombre de protons libérés (voir plus loin fig. 30). On peut donc penser qu'à pH 6,9 la rétrogradation de la dissociation est pratiquement complète et en déduire que les protons libérés ne proviennent que de la caséine $\varkappa$ non combinée à la caséine α_s lorsque la concentration de cette dernière n'est pas suffisante pour saturer toute la caséine $\varkappa$. Il s'ensuit que le rapport $\alpha = \frac{v_{\alpha_s}}{v}$ est tel que $\frac{v_{\alpha_s}}{v} = \frac{\text{caséine } \varkappa \text{ libre}}{\text{caséine } \varkappa \text{ totale}} = \frac{(S)}{s}$ (6).

L'équilibre (2) est toujours réalisé et d'après l'équation (3) nous avons :

(7) $$\frac{v_{\alpha_s}}{v} = \alpha = \frac{1}{1 + \frac{(\alpha_s)^n}{K_\varkappa}}.$$

Or l'inhibition ne portant pas sur la réaction enzymatique elle-même l'expression de la vitesse d'hydrolyse est toujours de la forme $v = \frac{k_s e s}{K_m + s}$ où s représente la caséine $\varkappa$ libre et la caséine $\varkappa$ combinée avec la caséine α_s.

Par suite $$v_{\alpha_s} = \frac{k_s e s}{K_m + s} \times \frac{1}{1 + \frac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}}}$$

(8) ou $$v_{\alpha_s} = \frac{k_s e}{1 + \frac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}}} \times \frac{s}{K_m + s}.$$

D'après l'équation (7) nous avons :

(9) $$\frac{\alpha}{1 - \alpha} = \frac{K_{\alpha_s}}{(\alpha_s)^n}.$$

Comme dans le cas de l'inhibition de la réaction enzymatique, si l'on porte $\log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$ en fonction de $\log (\alpha_s)$ la pente de la droite est égale à $-n$ mais l'ordonnée à l'origine est indépendante de la concentration en caséine $\varkappa$ et égale à $\log K_{\alpha_s}$.

5422. — *Cas particuliers.*

Ils sont les mêmes que précédemment. Si n est grand on n'observe l'inhibition que pour les faibles valeurs de s et si (α_s) peut être assimilée à la concentration en caséine α_s totale, l'inhibition est du type non compétitif. Enfin si (α_s) est du même ordre que s, quand s augmente la quantité $1 + \frac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}}$ décroît et tend vers 1. Pour des concentrations suffisamment élevées en caséine $\varkappa$, il n'y aura plus d'inhibition apparente comme si l'inhibition était compétitive. En fait c'est une inhibition que nous pourrions appeler pseudo compétitive comme dans le cas précédent où l'inhibition portait sur la réaction enzymatique quand l'inhibiteur qui se fixe sur le substrat, n'est plus en excès par rapport au substrat.

Comme dans le cas de l'inhibition enzymatique nous ne considérerons que les vitesses initiales $v_{0\alpha_s}$ mesurées pour les concentrations initiales s_0 de caséine $\varkappa$.

543. — Étude expérimentale de l'inhibition en fonction de la concentration en caséine $\varkappa$

Nous avons représenté dans les figures 28 et 29 la variation de la vitesse initiale $v_{0\alpha_s}$ en fonction de $v_{0\alpha_s}/s_0$, selon la représentation d'Eadie. Nous avons aussi indiqué les résultats obtenus avec la caséine $\varkappa$ seule, dans les mêmes conditions. Bien que l'inhibition soit d'autant plus faible que la concentration en caséine $\varkappa$ est plus grande, c'est-à-dire qu'elle présente un caractère compétitif, on voit que les points expérimentaux ne sont pas répartis sur une droite qui couperait l'axe des ordonnées au point de vitesse maximum obtenue lors de l'hydrolyse de la caséine $\varkappa$ seule. Dans l'une et l'autre hypothèses envisagées pour expliquer le mécanisme d'inhibition (§ 5412 et 5422) cela se produit quand la concentration en inhibiteur libre (la caséine α_s) est du même ordre que celle de son substrat. Seule la caséine $\varkappa$ est en concentration suffisante pour remplir cette condition car les concentrations en présure sont toujours très faibles. Cette remarque confirme l'hypothèse d'une association entre la caséine α_s et la caséine $\varkappa$.

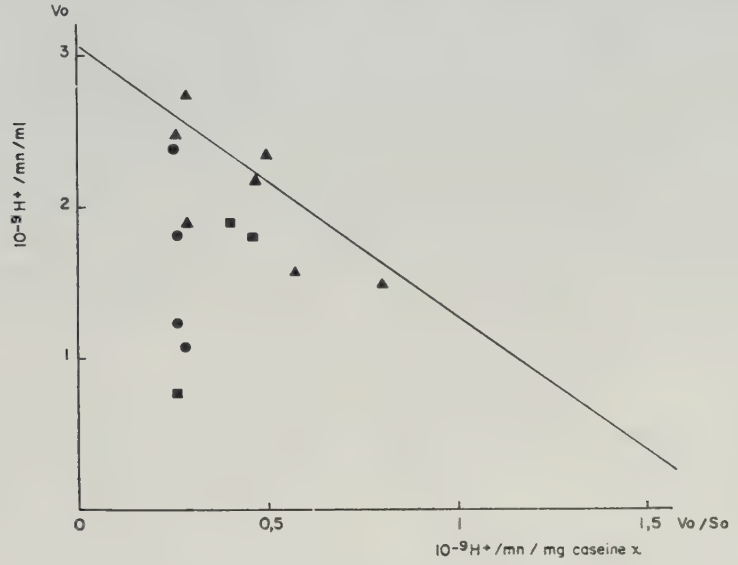

Fig. 28. — *Étude de l'inhibition due à la présence de la caséine α_s en fonction de la concentration en caséine $\varkappa$ et pour une concentration en présure de* $4{,}1 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml.

▲ sans ajouter de caséine α_s,
■ concentration en caséine α_s : 1 mg/ml,
● concentration en caséine α_s : 2 mg/ml.
Température : 40,3°C, pH 6,95, NaCl 0,1 M.
En abscisses : rapport entre la vitesse initiale v_0 et la concentration initiale s_0 de caséine $\varkappa$, exprimé en H⁺/mn/mg de caséine $\varkappa$;
En ordonnées : vitesse initiale, exprimée en H⁺/mn/ml.

544. — Étude expérimentale de l'inhibition en fonction de la concentration en caséine α_s

D'après le type d'inhibition observé au paragraphe 543, la concentration en caséine α_s libre est du même ordre que celle de la caséine $\varkappa$ et par conséquent elle ne peut-être assimilée à la concentration en caséine α_s totale, celle-ci étant elle-même

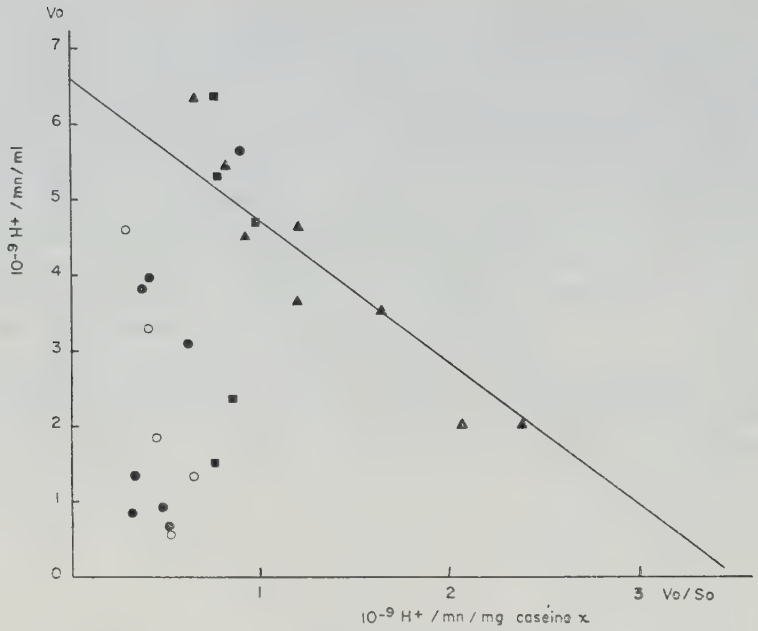

FIG. 29. — *Étude de l'inhibition due à la présence de caséine α_s en fonction de la concentration en caséine $\varkappa$ et pour une concentration en présure de* $8{,}2.10^{-3}$ U.P./ml.

▲ sans ajouter de caséine α_s,
■ concentration en caséine α_s : 1 mg/ml,
● concentration en caséine α_s : 2 mg/ml,
o concentration en caséine α_s : 2 mg/ml, (points calculés).
Température : 40,3°C, pH 6,95, NaCl 0,1 M.
En abscisses : rapport entre la vitesse initiale v_0 et la concentration initiale s_0 de caséine $\varkappa$, exprimé en H+/mn/mg de caséine $\varkappa$;
En ordonnées : vitesse initiale, exprimée en H+/mn/ml.

du même ordre de grandeur. Pour connaître d'après nos résultats cinétiques la concentration en caséine α_s libre, il nous faut calculer la concentration en complexe α_s-$\varkappa$ et établir sa formule.

La concentration du complexe α_s-$\varkappa$ se calcule facilement en observant que $s_0 = (S_0) + (S_0(\alpha_s)_n)$ et que la valeur de (S_0) est donnée par la valeur de la vitesse initiale observée en présence de caséine α_s. Dans l'hypothèse de l'inhibition de la réaction enzymatique (S_0) est tiré de l'expression de la vitesse (§ 11, équation (2)) appliquée à la vitesse initiale et où s_0 est remplacé par (S_0) soit :

$$v_{0\alpha_s} = \frac{k_s e(S_0)}{K_m + (S_0)} \qquad \text{ou} \qquad (S_0) = \frac{v_{0\alpha_s} K_m}{k_s e - v_{0\alpha_s}}$$

et dans l'hypothèse du « masquage » du groupe carboxylique :

$$(S_0) = v_{0\alpha_s} \frac{(K_m + s_0)}{k_s e}$$

d'après l'équation (6) et l'expression de la vitesse, v (§ 11, équation (2)) appliquée aux conditions initiales.

Nous avons représenté, dans le tableau 7, la concentration en caséine $\varkappa$ libre, (S_0), calculée dans l'hypothèse du « masquage » du carboxyle. Par différence nous en avons déduit la concentration du complexe $S_0\,(\alpha_s)_n$. Les études faites par WAUGH (24)

TABLEAU 7

Constante de dissociation caséine $\varkappa$-caséine α_s à 40°C

$v_0\alpha_s$ 10^{-9} H+/mn/ml	Caséine $\varkappa$ (1) totale s_0 10^{-5} M	Caséine $\varkappa$ non combinée (S_0) 10^{-5} M	Complexe α_s-$\varkappa$ $(S_0'(\alpha_s)_n)$ 10^{-5} M	Caséine α_s (2) non combinée (α_s) 10^{-5} M		$K\,\alpha_s = \frac{(S_0)\,(\alpha_s)}{(S_0\alpha_s)}$ 10^{-5} M
				$n = 1$	$n = 2$	
0,66	2,3	0,54	1,76	4,84	3,1	1,5 ± 0,1
0,93	3,4	0,95	2,45	4,15	1,7	1,6 ± 0,1
0,85	4,8	1,04	3,76	2,84	< 0,01	0,8 ± 0,2
1,32	7,1	2,1	5,0	1,6	< 0,01	0,7 ± 0,3
3,05	8,9	5,6	3,3	2,7	< 0,01	4,5 ± 2
3,99	17	12,2	4,8	1,8	< 0,01	4,5 ± 3
3,81	17	12,0	5	1,6	< 0,01	3,8 ± 3

(1) Calculée sur la base de l'unité cinétique de 55 000 g.
(2) Calculée sur la base d'un poids moléculaire de 30 000.
Concentration en caséine α_s totale : 6,6 10^{-5} M (2 mg/ml).

sur les réactions entre les caséines $\varkappa$ et α_s avaient conduit l'auteur à considérer que 3 molécules de caséine α_s se combinaient à une molécule de caséine $\varkappa$. Cependant nos résultats expérimentaux ne sont pas compatibles avec une telle formule et s'accordent mieux avec l'hypothèse d'une combinaison molécule à molécule. En effet, une fois

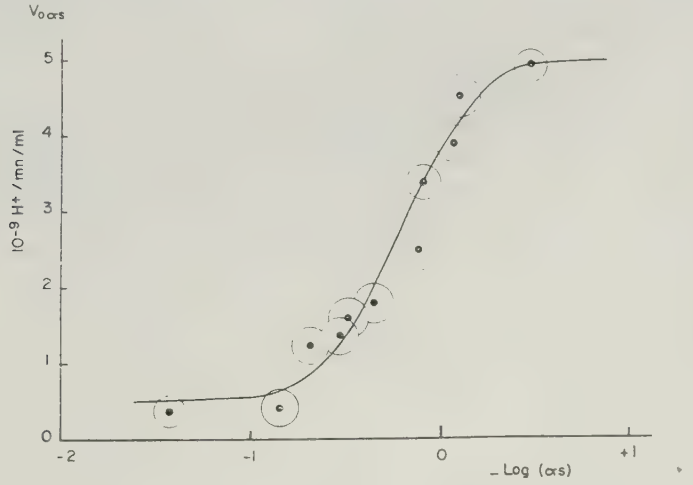

FIG. 30. — *Variation de la vitesse initiale en fonction du logarithme de l'inverse de la concentration en caséine α_s libre.*

Température : 35°C, pH 6,95, NaCl 0,1 M ;
Concentration en présure : 14.10^{-3} U.P./ml ;
Concentration en caséine $\varkappa$: $s = 2$ mg/ml.
En abscisses : logarithme décimal de l'inverse de la concentration de caséine α_s libre exprimée en mole $\times$ 10^5
En ordonnées : vitesse initiale exprimée en H+/mn/ml.

toute la caséine α_s fixée sur la caséine $\varkappa$, toute caséine $\varkappa$ ajoutée ensuite au mélange reste libre et donne lieu à une libération normale de protons sans que l'on observe d'inhibition. Si nous supposions que deux molécules de caséine α_s et à fortiori 3, se combinaient à une unité cinétique de caséine $\varkappa$, il faudrait très peu de caséine $\varkappa$ pour fixer toute la caséine α_s c'est-à-dire pour ne plus observer d'inhibition, ce qui n'est pas le cas (cf tableau 7 pour $n = 2$ et fig. 29 où $\alpha_s = 2$ mg/ml soit $6{,}6 . 10^{-5}$ M). Sur la base de $n = 1$ nous avons alors calculé la concentration en caséine α_s libre.

D'après les relations (4) ou (8), si l'on étudie la vitesse initiale, $v_{0\alpha_s}$, en fonction du logarithme de l'inverse de la concentration en caséine α_s libre, on doit obtenir une courbe, en S, classique de la relation « dose-effet ». Tel est bien le résultat indiqué dans la figure 30 où nous avons représenté pour chaque point les erreurs expérimentales. D'après les relations (5) ou (9) appliquées aux vitesses initiales et où $\alpha = \frac{v_{0\alpha s}}{v_0}$ nous avons porté le logarithme de $\frac{v_{0\alpha s}}{v_0 - v_{0\alpha s}}$ en fonction du logarithme de la concentration en caséine α_s libre exprimée en mole et nous avons trouvé comme valeur de la constante de dissociation caséine $\varkappa$-caséine α_s $K\alpha_s = 2 \pm 0{,}5 . 10^{-5}$ M à 35°C (voir fig. 31). La précision des mesures, indiquées sur quelques points expérimentaux ne permet pas de vérifier que l'ordonnée à l'origine de la droite ne dépend pas de la concentration en caséine $\varkappa$. L'inverse de $K\alpha_s$, constante d'association de la caséine α_s avec la caséine $\varkappa$, est élevée et du même ordre de grandeur que la constante d'association de

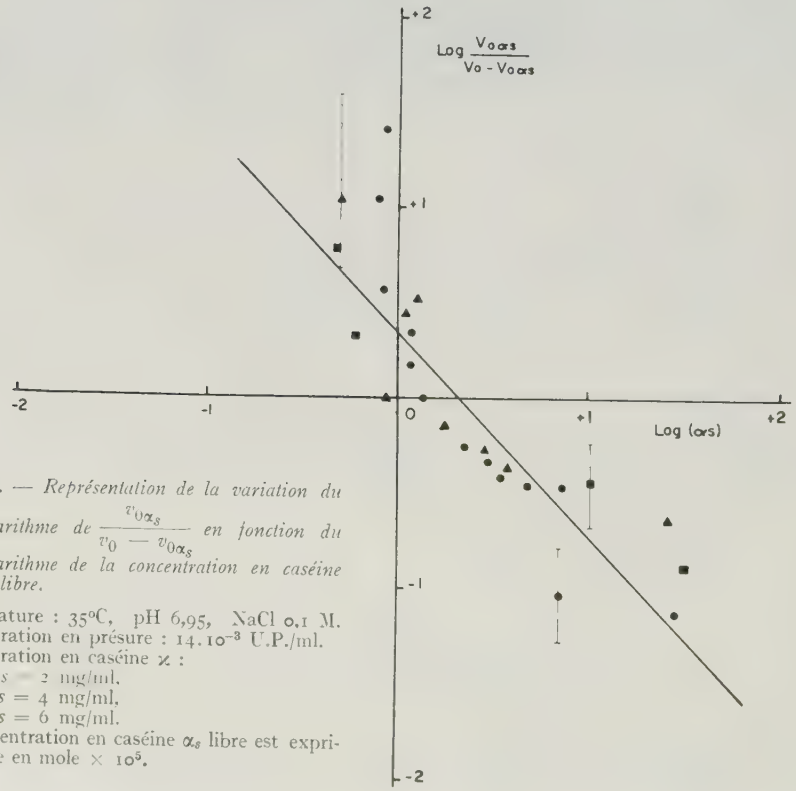

FIG. 31. — *Représentation de la variation du logarithme de* $\frac{v_{0\alpha_s}}{v_0 - v_{0\alpha_s}}$ *en fonction du logarithme de la concentration en caséine* α_s *libre.*

Température : 35°C, pH 6,95, NaCl 0,1 M.
Concentration en présure : $14 . 10^{-3}$ U.P./ml.
Concentration en caséine $\varkappa$:
● $s = 2$ mg/ml,
▲ $s = 4$ mg/ml,
■ $s = 6$ mg/ml.
La concentration en caséine α_s libre est exprimée en mole $\times 10^5$.

la présure avec la caséine $\varkappa$. La pente de la droite $n = 1{,}05$ montre bien que l'hypothèse d'une combinaison molécule à molécule correspond à nos résultats expérimentaux.

La caséine α_s utilisée dans nos expériences a été récemment considérée par WAUGH comme constituée de 80 p. 100 d'un composant, α_{s2} et 20 p. 100 d'un autre composant α_{s1} (47). Il est possible que l'un d'entre eux seulement soit responsable du blocage du groupe carboxylique quoique tous deux puissent former d'après WAUGH des complexes avec la caséine $\varkappa$. Cette considération ne change pas la valeur de n mais peut modifier la valeur de $K\alpha_s$ sans en changer cependant l'ordre de grandeur.

55. — Discussion et conclusion

La précision des mesures ne permet pas de vérifier, d'après nos résultats d'étude cinétique de la protéolyse, s'il s'agit d'une inhibition de la réaction enzymatique ou non. En particulier les variations de $K\alpha_s$ en fonction de s ne sont pas significatives. Cependant les résultats calculés d'après cette hypothèse conduisent souvent à des chiffres de vitesses initiales manifestement erronés alors que ceux calculés d'après l'hypothèse de la rétrogradation de la dissociation du carboxyle coïncident mieux avec les valeurs expérimentales. Nous donnons un exemple des valeurs calculées de la vitesse initiale $v_{0\alpha_s}$ d'après la relation (8) dans la figure 29. Nous avons choisi $n = 1$, $K\alpha_s = 1{,}5 \cdot 10^{-5}$ M, $k_s e = 6{,}6 \cdot 10^{-9}$ H^+/mn/U. P., $K_m = 1{,}8$ mg/ml et 2 mg/ml de caséine α_s totale. Cet ensemble de résultats, joint au fait que la libération du caséino-glycopeptide n'est pas modifiée, permet de dire que l'hypothèse la plus vraisemblable est celle de la rétrogradation de l'ionisation du groupe carboxyle.

L'inhibition apparente qui en résulte est complète pour des concentrations en caséine α_s relativement faibles comparée à celles utilisées par WAUGH pour étudier la formation du complexe caséine $\varkappa$-caséine α_s. Le chiffre de trois molécules de caséine α_s que cet auteur a trouvé doit plutôt correspondre au nombre maximum de molécules de caséine α_s que la caséine $\varkappa$ est susceptible de fixer. L'on conçoit qu'il suffise de la présence d'une molécule de caséine α_s pour entraîner la rétrogradation de la dissociation du carboxyle et la fixation de deux autres molécules n'y ajoutera rien et ne se marquera pas par une nouvelle diminution du nombre de protons libérés. On peut en déduire également que la constante d'association de la caséine $\varkappa$ avec cette première molécule de caséine α_s est beaucoup plus élevée que celle des deux autres.

A moins d'envisager une action à distance par transmission intramoléculaire on peut concevoir que la caséine α_s se fixe en un point proche du site d'attaque de l'enzyme, mettant par exemple, à proximité du carboxyle une charge positive qui l'empêcherait de se dissocier. Cependant ce site de fixation de la caséine α_s doit être différent de celui de l'enzyme, sinon on observerait une inhibition de la réaction enzymatique elle-même. Cette association a pour résultat de rétrograder complètement à pH 7 la dissociation du groupe carboxylique. Comme la précipitation de la caséine $\varkappa$ est également inhibée, il est possible d'assigner à ce groupe un rôle dans la formation des fibrilles de la paracaséine $\varkappa$.

A 35°C, la constante d'association de la caséine α_s avec la caséine $\varkappa$ est du même ordre que celle de la présure avec la caséine $\varkappa$ et la vitesse de formation de ce complexe est grande, plus grande que celle de la formation du complexe enzyme-substrat.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Après avoir étudié la libération du caséino-glycopeptide et la sensibilité de la caséine entière au calcium nous avons vu que nous pouvions relier l'activité coagulante de la présure cristallisée à la libération de protons, observée au cours de l'attaque de la caséine $\varkappa$ par la présure.

La mesure du nombre de protons libérés à différents pH nous a permis de conclure que ces protons venaient de la dissociation d'un groupe carboxylique de pK compris entre 4 et 5 et que, par suite, l'activité de la présure pouvait être caractérisée par la rupture d'une seule liaison ester. C'est la première fois qu'une telle activité est signalée et qu'une tentative est faite pour définir, sur des bases expérimentales, la nature de l'activité de la présure cristallisée en rapport avec le phénomène de coagulation du lait.

L'absence de produits intermédiaires — puisqu'une seule liaison ester est rompue par molécule — et la concordance entre les différentes techniques d'étude permettent d'interpréter les mesures cinétiques que nous avons faites comme correspondant à l'union de la présure avec son substrat, la caséine $\varkappa$, et non avec des produits intermédiaires plus ou moins dégradés.

Nous avons trouvé, au cours des études cinétiques, que la constante de Michaelis ne variait pas avec la température et pouvait être confondue avec la constante de dissociation du complexe présure-caséine $\varkappa$. Son inverse, la constante d'association, est du même ordre de grandeur que celui trouvé pour d'autres types de protéolyse par d'autres enzymes protéolytiques.

La constante de vitesse de décomposition du complexe intermédiaire présure-caséine $\varkappa$ est très grande et comparable à celles de certaines estérases. Elle correspond à l'observation bien connue qu'il suffit d'ajouter au lait de très petites quantités de présure cristallisée pour obtenir la coagulation.

La variation de l'enthalpie d'activation est faible et assez caractéristique de l'hydrolyse des liaisons esters.

Nous avons observé une action inhibitrice de la caséine α_s sur la formation de fibrilles par la paracaséine $\varkappa$ et sur la libération de protons, étudiée par la méthode titrimétrique à pH 7.

L'étude du mécanisme de cette inhibition nous a permis de mettre en évidence, en accord avec les travaux de Waugh, une interaction particulière entre la caséine $\varkappa$ et la caséine α_s, interaction dont nous avons pu, grâce à une étude cinétique, déterminer quelques caractéristiques.

Les travaux effectués par Waugh sur les interactions caséine $\varkappa$-caséine α_s ont déjà permis d'apporter des données intéressantes sur le phénomène de coagulation

lui-même. En particulier WAUGH a trouvé que trois molécules de caséine α_s se combinaient d'une manière réversible à une molécule de caséine $\varkappa$ pour former un complexe susceptible de se polymériser en présence de calcium et de constituer des micelles stables, analogues à celles que l'on rencontre naturellement dans le lait. Ces observations conduisaient à attribuer à la caséine $\varkappa$ un rôle de stabilisateur de la caséine α_s vis-à-vis du calcium (en l'absence de caséine $\varkappa$, la caséine α_s est pratiquement insoluble en présence de calcium et précipite). La paracaséine $\varkappa$ ne possède plus cette propriété et l'on peut considérer par suite la caséine $\varkappa$ comme celui des différents constituants de la caséine entière qui représente le véritable substrat de la présure dans le phénomène de coagulation. Ce dernier point explique tout l'intérêt d'une étude cinétique effectuée sur la caséine $\varkappa$, étude qui a d'ailleurs révélé une grande sensibilité de la caséine $\varkappa$ à la présure et est venue ainsi confirmer les résultats obtenus parallèlement par WAKE (48).

L'inhibition observée avec la caséine α_s peut s'expliquer par l'union réversible entre une molécule de caséine α_s et une molécule de caséine $\varkappa$ en un point proche du site d'attaque de la présure mais différent de son site de fixation.

Cette association a pour conséquence la rétrogradation de la dissociation à pH 7 du groupe carboxylique de la liaison ester coupée. Comme la formation de fibrilles est également inhibée, on peut penser que le groupe carboxylique joue un rôle dans cette formation.

La constante d'affinité de la caséine α_s pour la caséine $\varkappa$ — pour le site de fixation particulier conduisant au blocage du carboxyle —, est du même ordre que celle de la présure pour la caséine $\varkappa$, soit : $5 \pm 1.10^4\ M^{-1}$. L'affinité des deux protéines entre elles est donc grande et analogue à celle d'un enzyme pour son substrat. La formation du complexe caséine $\varkappa$-caséine α_s est très rapide, plus rapide même que celle de la formation du complexe enzyme-substrat lui-même puisque nous avons observé la même inhibition en ajoutant simultanément la présure et la caséine α_s à la caséine $\varkappa$.

Nos mesures ne permettent pas de suivre la fixation des deux autres molécules de caséines α_s qui peuvent se combiner également à la caséine $\varkappa$ d'après WAUGH mais on peut penser que leur constante d'association est beaucoup plus faible.

Ainsi trouvons-nous une interaction remarquable entre deux protéines isolées de la caséine entière, comparable à celle qui intervient dans la formation d'un complexe enzyme-substrat mais sans qu'il en résulte une activité catalytique. La réaction est réversible et entraîne pour le complexe une propriété nouvelle, celle de former des hauts polymères avec le calcium ou micelles de poids moléculaire compris entre 10^7 et 3.10^9 (49), en équilibre d'après WAUGH (24) avec de petits polymères. Leur grande stabilité est unique parmi les suspensions micellaires connues et représente d'ailleurs une des principales propriétés mises à profit dans l'utilisation du lait par l'homme.

SOMMAIRE

1° Au cours de l'action de la présure cristallisée nous avons trouvé une relation linéaire entre la libération du caséino-glycopeptide et la sensibilité au calcium de la caséine entière d'une part, la libération de protons à partir de la caséine $\varkappa$ d'autre part. Nous en avons déduit que la cinétique de la libération des protons à partir de la caséine $\varkappa$ était en relation directe avec l'activité coagulante de l'enzyme.

2° L'activité de la présure sur la caséine $\varkappa$ est marquée par l'apparition d'un groupe, de pK compris entre 4 et 5, identifié à un groupe carboxylique et consécutif à la coupure de $1 \times N$ liaisons esters pour 55 000 g de caséine $\varkappa$, N étant le nombre d'Avogadro.

3° La constante de Michaelis pour la caséine $\varkappa$ en milieu NaCl 0,1 M à pH 6,9 ne varie pas avec la température entre 25 et 40°C. Sa valeur est :

$$1{,}8 \pm 0{,}2 \text{ mg/ml ou } 3{,}3 \pm 0{,}3 . 10^{-5} \text{ M}$$

et se confond avec la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat.

4° La constante de vitesse de décomposition du complexe présure-caséine $\varkappa$ a été trouvée égale à

$$36 \pm 4 \text{ secondes}^{-1} \text{ à } 35°\text{C}.$$

5° La variation d'enthalpie correspondant à l'activation du complexe intermédiaire enzyme-substrat est :

$$\Delta H^* = 6\,300 \pm 400 \text{ cal./mole.}$$

A 35°C les variations d'énergie libre et d'entropie d'activation du complexe intermédiaire sont respectivement :

$$\Delta F^* = 15\,800 \pm 100 \text{ cal./mole}$$
$$\Delta S^* = -31 \pm 1{,}5 \text{ cal./degré/mole.}$$

6° L'addition de caséine α_s à la caséine $\varkappa$ entraîne :

a) une diminution du nombre de protons libérés déterminé par la méthode titrimétrique à pH 6,9;

b) une inhibition de la formation des fibrilles par la paracaséine $\varkappa$.

7° L'inhibition par la caséine α_s peut s'expliquer par l'union réversible entre une molécule de caséine α_s et une molécule de caséine $\varkappa$ en un point proche du site d'attaque de la présure mais différent du site de fixation de l'enzyme.

Cette union a pour conséquence la rétrogradation de la dissociation à pH 7 du groupe carboxylique apparaissant après rupture de la liaison ester. Ce groupe doit jouer un rôle dans l'association en fibrilles des molécules de paracaséine $\varkappa$.

8° La vitesse de formation du complexe caséine α_s et caséine $\varkappa$ est très grande, supérieure à celle qui correspond à la formation du complexe enzyme-substrat. A 35°C la constante d'association de la caséine α_s avec la caséine $\varkappa$ est :

$$5 \pm 1 . 10^4 \text{ M}^{-1},$$

elle est grande et du même ordre que celle de la présure avec la caséine $\varkappa$.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Fish, J. C., 1957. Activity and specificity of rennin. Nature, **180**, 345.

(2) Berridge, N. J., 1945. The purification and crystallization of rennin. *Biochem. J.*, **39**, 179-186.

(3) Foltmann, B., 1959. Studies on rennin. II. On the crystallization, stability and proteolytic activity of rennin. *Acta chem. scand.*, **13**, 1927-1935.

(4) Nitschmann, Hs. et Varin, R., 1951. IV. Die Proteolyse des Caseins durch Kristallisiertes Lab. *Helv. chim. Acta*, **34**, 1421-1430.

(5) Alais, C., Mocquot, G., Nitschmann, Hs. et Zahler, P. 1953. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch VII. Über die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (N. P. N.) aus Casein durch Lab und ihre Beziehung zur Primärreaktion der Labgerinnung der Milch. *Helv. chim. Acta*, **36**, 1955-1968.

(6) Nitschmann, Hs. et Henzi, R. 1959. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. XIII. Untersuchung der bei der Labung in Freiheit gesetzten Peptide. *Helv. chim. Acta*, **42**, 1985-1995.

(7) ALAIS, C. 1956. Étude des substances azotées non protéiques (N. P. N.) séparées de la caséine du lait de vache sous l'action de la présure. XIV^e Congr. int. Laiterie, **2**, 823-839.

(8) MATTENHEIMER, H. et NITSCHMANN, Hs. 1955. Die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (N. P. N.) aus Casein durch verschiedene proteolytische Fermente, verglichen mit der Abspaltung durch Lab. *Helv. chim. Acta*, **38**, 687-698.

(9) TSUGO, T. et YAMAUCHI, R. 1960. Specific liberation of N. P. N. from κ casein fraction by rennin and pepsin. *Bull. agric. chem. Soc. Japan*, **24**, 96-100.

(10) NITSCHMANN, Hs. et BOHREN, H. U. 1955. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. Eine Methode zur direkten Bestimmung der Geschwindigkeit des Primärreaktion der Labgerinnung der Milch. *Helv. chim. Acta*, **38**, 1953-1963.

(11) LINDERSTRØM-LANG, K. 1929. Studies on casein. On the fractionation of casein. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **17**, 9, 1-116.

(12) WAUGH, D. F. et VON HIPPEL, P. H. 1956. κ casein and the stabilization of casein micelles. *J. am. chem. Soc.*, **78**, 4576-4582.

(13) HENRI, V. 1903. Lois générales de l'action des diastases. *Thèse, Paris.*

(14) MICHAELIS, L. et MENTEN, M. L. 1913. Die kinetic der Invertinwirkung. *Biochem. Z.*, **49**, 333-369.

(15) BRIGGS, G. E. et HALDANE, J. B. S. 1925. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem. J.*, **19**, 338-339.

(16) HALDANE, J. B. S. 1930. Enzymes. Longmaus, Green and Co ; Londres.

(17) EADIE, G. S. 1952. Evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions. *Science*, **116**, 688.

(18) ALAIS, C. 1955. Préparation de présure cristallisée à partir d'estomacs de veaux (caillettes). *Ann Tech., I. N. R. A.*, **4**, 113-120.

(19) ALAIS, C. Communication personnelle.

(20) STORCH, J. et SEGELCKE, Th. 1874. Versuche über das Gerinnen der Milch. *Milchztg*, **3**, 997.

(21) SCHWANDER, H., ZAHLER, P. et NITSCHMANN, Hs. 1952. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. V. Analytische Untersuchungen an Kristallisiertem Lab. *Helv. chim. Acta*, **35**, 553-560.

(22) HAMMARSTEN, O. 1883. Zur Frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei. *Z. Physiol. Chem.*, **7**, 227-273.

(23) VON HIPPEL, P. H. et WAUGH, D. F. 1955. Casein : monomers and polymers. *J. am. chem. Soc.*, **77**, 4311-4319.

(24) WAUGH, D. F. 1958. The interactions of α_s-β- and κ-caseins in micelle formations. *Faraday Soc. Discus.*, **25**, 186-192.

(25) MCKENZIE, H. A. et WAKE, R. G. 1961. An improved method for the isolation of κ-casein. *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 240-242.

(26) MCKENZIE, H. A. et WAKE, R. G. 1959. Studies of casein. *Aust. J. Chem.*, **12**, 712.

(27) WAUGH, D. F., LUDWIG, M., GILLESPIE, J. M., GARNIER, J., KLEINER, E. S. et NOBLE, R. W. 1960. Certain Properties of α_s-casein. *Fed. Proc.*, **19**, *Part .I*, 337.

(28) LINDERSTRØM-LANG, K. 1927. Volumetric determination of amino-nitrogen. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **17**, n° 4.

(29) VAN SLYKE, D. D. 1929. Manometric determination of primary amino-nitrogen and its application to blood analysis. *J. Biol. Chem.*, **83**, 425-447.

(30) LEA, C. H. 1947-1948. Determination of the free amino-nitrogen of casein and of fresh and deteriorated milk protein by the van SLYKE method. *J. Dairy Res.*, **15**, 364-368.

(31) NITSCHMANN, Hs. et BEEBY, R. 1960. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. XIV Aminosäurezusammensetzung des aus κ-Casein durch Lab in Freiheit gesetzten Glykomakropeptid. *Chimia*, **14**, 318-319.

(32) JOLLES, P., ALAIS, C. et JOLLES, J. 1961. Étude comparée des caséino-glycopeptides formés par action de la présure sur les caséines de vache, de brebis et de chèvre. I. Étude de la partie peptidique. ALAIS. C. et JOLLES, P. 1961. II. Étude de la partie glucidique. *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 309-314, 315-322.

(33) WALEY, S. G. et WATSON, J. 1953. The action of Trypsin on Polylysine. *Biochem. J.*, **55**, 328.

(34) JACOBSEN, C. F., LEONIS, J., LINDERSTRØM-LANG, K. et OTTESEN, M. 1957. The pH-stat and its use in biochemistry. In : *Met. biochem. Analysis*, **4**, 171-210. *Intersc. Pub. New York.*

(35) NITSCHMANN, Hs., WISSMANN, H. et HENZI, R. 1957. Über ein Glyko-Makropeptid ein spaltprodukt des Caseins, erhalten durch Einwirkung von Lab. *Chimia*, **11**, 76.

(36) BRUNNER, J. R. et THOMPSON, M. P. 1959. Some charateristics of the glyco-macropeptide of casein. A product of the primary rennin action. *J. Dairy Sci.*, **42**, 1881-1883.

(37) NITSCHMANN, Hs. et KELLER, W. 1955. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. IX. Über die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (N. P. N.) aus isoliertem α und β Casein durch Lab. *Helv. chim. Acta*, **38**, 942-946.

(38) KLOTZ, I. M. 1954. A symposium on the mechanism of enzyme action, John Hopkins Press.

(39) WAKE, R. G. 1959. V. The action of rennin on casein. *Aust. J. biol. Sci.*, **12**, 479-489.

(40) LABEYRIE, F. et YON, J. 1953. Détermination de la constante de MICHAELIS dans la protéolyse de la β-lactoglobuline native en présence de trypsine. *J. Chim. Phys.*, **50**, 186.

(41) YON, J. 1958. Protéolyse de la β-lactoglobuline native par la chymotrypsine. I — Étude cinétique et thermodynamique de la réaction. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **40**, 45-58.

(42) D'après LAIDLER, K. J. 1958. The chemical kinetics of enzyme action. Clarendon Press, Oxford.

(43) SCHWERT, G. W. et EISENBERG, M. A. 1949. The kinetics of the amidase and esterase activities of trypsin. *J. biol. Chem.*, **179**, 665-672.

(44) HARMON, K. M. et NIEMAN, C. 1949. The hydrolysis of N-benzoyl-L-argininamide by crystalline trypsin. *J. biol. Chem.*, **178**, 743-750.

(45) SNOKE, J. E. et NEURATH, H. 1950. The effect of temperature on the esterase activity of chymotrypsin. *J. biol. Chem.*, **182**, 577-584.

(46) WAKE, R. G. et BALDWIN, R. L. 1961. Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 225-239.

(47) WAUGH, D. F., LUDWIG, M., DREIZEN, P. et NOBLE, R. 1961. α_{s1} and α_{s2} caseins. *I Congr. int. Biophys. Stockholm.*

(48) WAKE, R. G. 1957. The action of rennin on casein. *Aust. J. Sci.*, **20**, 167-168.

(49) NITSCHMANN, Hs. 1949. Electronenmikroskopische Grössenbestimmung der Calciumcaseinatteilchen in Kuhmilch. *Helv. chim. Acta*, **32**, 1258-1264.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

SÉPARATION, IDENTIFICATION ET DOSAGE DES PROTÉINES DU LAIT DE VACHE A L'EXCLUSION DES CASÉINES

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 28 mai 1962.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur
de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 5-10-1962.

Dépôt légal : 4e trimestre 1962. *N° d'impression : 663.*